Prof. O. CASAGRANDI

L'immunità passiva nel vaccino e nel vaiolo

Estratto dagli *Annali d'Igiene sperimentale*, vol. XXV, fasc. I, anno 1915

TORINO
UNIONE TIPOGRAFICO-EDITRICE TORINESE
MILANO — ROMA — NAPOLI
1915

Prof. O. CASAGRANDI

L'immunità passiva nel vaccino e nel vaiolo

Estratto dagli *Annali d'Igiene sperimentale,* vol. XXV, fasc. I, anno 1915

TORINO
UNIONE TIPOGRAFICO-EDITRICE TORINESE
MILANO — ROMA — NAPOLI
1915

ISTITUTO D'IGIENE DELLA R. UNIVERSITÀ DI CAGLIARI.
Prof. O. CASAGRANDI, direttore

L'immunità passiva nel vaccino e nel vaiolo.[1]

INTRODUZIONE.

Dell'immunità passiva nel vaiolo e nel vaccino si parla da molto tempo: si può dire infatti non esista studioso il quale si sia a lungo occupato di queste due infezioni, il quale non abbia anche cercato di addentrarsi nell'argomento dell'immunità passiva, senza per altro che le indagini eseguite al riguardo fin oggi abbiano portato a risultati tali da potere condurre ad un orientamento definitivo.

Anch'io, dopo una serie di ricerche eseguite per ottenere l'immunità in diversi animali recettivi all'infezione vaccinica con la inoculazione per le vie endovenosa e sottocutanea del virus esistente in filtrati non contenenti, oltre lo stesso virus, altri germi dimostrabili (2), mi ero proposto di occuparmi delle proprietà antivacciniche dei sieri degli animali immunizzati, ma dovetti dilazionare queste nuove indagini di fronte alla necessità di precisare altri punti della dibattuta questione dell'immunità vaccinale (3).

Pubblico ora quanto ho fin qui fatto durante vari anni di indagini a cominciare dal 1908.

Premetto che fin dal 1907 trovai, dotato di qualche proprietà preventiva verso l'infezione vaccinica cutanea, il siero di animali

(1) Questo lavoro costituisce la seconda parte di uno studio, al quale mi sono accinto dal 1908, sui rapporti tra vaiolo bovino ed umano, studio che è pronto. Ho però creduto meglio fare una trattazione a parte della questione dell'immunità passiva, poichè via facendo lo studio di essa veniva assumendo una particolare indipendenza e fisionomia.

(2) *Sul conferimento dell'immunità antivaccinale con pus vaccinico filtrato attraverso le Berkefeld W, introdotto per la via endovenosa e sottocutanea.* Ann. Igiene sper., Roma, 1907, pag. 568.

(3) *Su alcune questioni relative all'immunità antivaccinale ottenuta con vaccino filtrato attraverso le Berkefeld W.* Ann. Igiene sper., Roma, 1909, pag. 324.

inoculati ripetute volte con vaiolo bovino filtrato, e precisamente i sieri di cani, capre, pecore e asini.

Col siero di capra riuscii anzi ad impedire, in un giovane cane (inoculandogliene 80 cmc. sottocute, dopo che era stato da 36 ore vaccinato con vaiolo bovino attivo), si presentasse una pustolosi così rigogliosa e diffusa come nel controllo; esperimento questo al quale ne rispondevano altri eseguiti su conigli, dimostranti la possibilità di ottenere un'immunità parziale, ma ben netta, in questi animali, inoculandoli in una sol volta, per via sottacutanea, con 25 cmc. del siero stesso, nelle prime 24 ore (non dopo 40) dallo avvenuto innesto del virus bovino sulla cute.

Ma le prime ricerche sull'immunità passiva nel vaccino e nel vaiolo, si può dire che si inizino cogli esperimenti di trasfusione di sangue da vitelli infetti di vaccino bovino a vitelli sani, eseguiti da Chauveau (1), da Raynaud (2) e proseguiti oltre che da altri (3) specialmente da Straus, Chambon e Ménard (4), ai quali si deve la constatazione che l'immunità nelle vitelle si provoca trasfondendo loro una gran quantità di sangue (4-6 kg.) raccolto al settimo giorno dall'eruzione vaccinica e non dopo più tempo (6 settimane).

Seguono quindi quegli studiosi, che ripeterono analoghi esperimenti servendosi del solo siero, tra cui sono da annoverare per i primi lo Sclavo e il Leoni (5), i quali riuscirono ad ottenere fatti immunitari nei conigli, talvolta con 1 cmc. di siero per kg. di animale e a ridurre i fenomeni suppurativi nelle vitelle, del peso di 150-160 kg., inoculandole con 120-150 cmc. di siero.

Importanti sono poi le ricerche di Béclère, Chambon e Ménard (6), che vennero dopo quelle di Hlava e Honl (7), i quali tre

---

(1) CHAUVEAU. *Nature du virus vaccin.. etc.* C. R. Acad. de Sciences, T. LXVI, 1868. *Contribut. a l'étude de la vaccine originelle. Recherches comp. sur l'aptitude vaccinogène dans les principales espèces vaccinifères.* Rev. de Méd. et de Chir., 1877.

(2) RAYNAUD. *Etude expér. sur le rôle du sang dans la transmission de l'immunité vaccinale.* C. R. Acad. de Sciences, 1877, pag. 453 e 517; Bull. de lAcad. de Méd., 1878, p. 878.

(3) Vedi i lavori di CRAMER et BOYCE (Brit. med. Journ., 1893); di LANDMANN (Z. f. Hyg., 1894); di REMBOLD (Cent. f. Bakt., Bd. 18); di BEUMER et PEIPER (Berl. klin. Woc., 1895).

(4) STRAUS, CHAMBON et MÉNARD. *Recherches expér. sur la vaccine chez le veau.* C. R. de la Soc. de Biol., 1890; La semaine méd., 1890, n. 57, pag. 470.

(5) SCLAVO e LEONI. *Del potere immunizzante del siero dei vitelli vaccinati con il cow-pox.* Atti XI Congr. intern. di medicina, Roma 1894.

(6) BÉCLÈRE, CHAMBON et MÉNARD. *Etude sur l'immunité vaccinale et le pouvoir immunisant du serum d'une génisse vaccinée.* Ann. Inst. Pasteur, 1896, p. 1.

(7) HLAVA et HONL. *Sérum vaccinicum und seine Werkungen.* Wiener klin. Rundschau, 1895, n. 41.

su citati AA., col siero di vitelle vaccinate raccolto dopo 10-50 giorni dalla vaccinazione ed inoculate per diversi giorni (5-8) sotto cute, riuscirono a modificare profondamente l'andamento della lesione cutanea in vitelle nuove, sino anche a non prodursi pustole, purchè il siero fosse inoculato in grande quantità (1-3 litri per 100-150 kg.). Una dose di siero nei rapporti di 1 a 100 in peso di animale, non era sufficiente secondo gli AA.

Con queste ricerche si inizia un periodo di interessanti indagini sull'immunità passiva nel vaccino, cui contribuirono anche due italiani: il Zagari (1), che dimostrò l'esistenza, sebbene in piccolo grado, di un potere immunizzante nel siero dei vaiolosi e degli animali trattati con materiale vaioloso, e il Tedeschi (2). Questi cominciò col precisare il momento nel quale nei bovini e nei bambini la vaccinazione conferisce l'immunità, e venne alla conclusione che nei primi essa risponde al momento in cui si fanno palesi le prime pustole e nei secondi che essa si afferma quando è avvenuto il riassorbimento del materiale pustoloso, ossia nel periodo regressivo della lesione.

Dopo ciò col siero di vitelle inoculate per via cutanea, raccolto 3-4-5-6 giorni dopo l'innesto del virus, praticò inoculazioni preventive in altre vitelle, le quali poi venivano vaccinate dopo 2 o 3 giorni, non riuscendo però neppure ad attenuare l'efflorescenza vaccinale. E si noti che le quantità del siero inoculate furono sempre molto rilevanti, da 800 a 1300 gr. in vitelle del peso variabile tra 20 a 70 kg.

Nè servendosi di siero di pecora o di siero di cavallo trattati con vaccino migliorò i suoi risultati.

Con questi sieri di pecora, di vitella e di cavallo inoculò poi sottocute bambini (1 gr. di siero per kg. di peso) senza ottenere la più lontana parvenza d'immunità.

Infine l'A. adoperò anche il sangue *in toto* con l'aggiunta del 25 % di glicerina, ripetendo gli esperimenti precedenti, ugualmente senza alcun risultato immunizzante.

Come si vede i tentativi dell'A. per ottenere passivamente la immunità nel vaccino, riuscirono completamente negativi, mentre invece furono positivi, però sulle vitelle, non sull'uomo, le inoculazioni sottocutanee di cow-pox, in seguito alle quali, secondo l'A., si immunizzerebbero le vitelle in 48 ore.

Vengono ora vari lavori di autori stranieri, ove con risultati positivi, ove con risultati negativi (3).

Ma gli studi più dettagliati e più precisi non apparvero che in questi ultimi tempi per opera di Camus, di Henseval e Convent, di Teissier e Marie e di Gastinel.

---

(1) Zagari. *Alcune ricerche sulla sieroterapia antivaiolosa.* L'Ufficiale Sanitario, Napoli, anno X, 1897.

(2) Tedeschi. *La immunizzazione del vaccino e del vaiolo.* Tipografia Soc. Tipografi, Trieste, 1901

(3) Chaumier et Rehns. *Notes expér. sur la vaccine.* C. R. Soc. Biol., 1903; Riesel. *Ueber passive Imm. g. Vaccine* (citati da Süpfle: v. più oltre).

Il Camus (1) si prefisse di precisare il grado d'attività del siero dei conigli immunizzati, di ricercare l'influenza del tempo sull'immunizzazione passiva, di determinare, tenendo conto esatto del tempo dell'infezione, il valore preventivo e curativo del siero attivo, di realizzare infine le condizioni atte ad assicurare all'organismo un'immunità passiva assoluta.

Egli trovò che il sangue di coniglio immunizzato (raccolto dopo quattro settimane dall'inoculazione per via cutanea) inoculato nelle vene a conigli nuovi, determinava una certa immunità cutanea variabile a seconda della dose inoculata, sebbene più considerevole se la massa sanguigna era grande, sempre che la inoculazione fosse fatta in una sol volta.

Partendo dalla dose di 10 cmc. per kg. di peso di animale, il Camus trovò che era del tutto inutile attendere del tempo perchè l'immunità si determinasse: dopo 12 giorni, egli dice, non è più forte di quello che si presenta dopo 5 o 3 giorni, o subito dopo l'inoculazione del siero.

Assodò ancora che il siero iniettato ad un animale normale non ha azione sull'evoluzione del virus se non quando precede o accompagna la vaccinazione; poche ore dopo l'introduzione del virus nell'organismo, l'iniezione del siero è senza azione.

Per determinare l'immunità passiva assoluta, avendo già assodato che con 20-25 cmc. di siero iniettati a 5 cmc. al giorno per 14 giorni, non si determinava l'immunità completa, adoperò delle dosi più forti, quale quella di cmc. 36.7 in una sol volta per kg. di animale, con cui ottenne i migliori risultati, senza per altro che, leggendo i diari, si possa affermare che le cuti degli animali trattati fossero completamente immunizzate. Servendosi del sangue i risultati non si mostrarono più chiari: l'A. stesso dice che l'immunità passiva per mezzo del sangue è difficilissima a realizzarsi.

È d'opinione anche, per ottenere l'immunità passiva completa, bisogni trasfondere una quantità di siero o di sangue che corrisponda presso a poco alla massa totale del sangue del corpo.

Henseval e Convent (2) hanno cercato di delucidare anch'essi vari punti dell'immunità vaccinica, come vedremo meglio fra poco, cioè se la quantità di sostanze antivirulente contenute nel sangue degli animali dipenda dalla quantità di vaccino che loro è stato inoculato; in qual momento la sostanza antivirulenta apparisce nel sangue e se questo momento corrisponda a quello in cui la pelle diventa refrattaria ad una nuova inoculazione, quale sia l'azione preventiva e curativa del siero degli animali vaccinati.

Fermandoci, in questa introduzione, alle loro ricerche sulla immunità passiva, dirò che gli AA. avrebbero trovato che il siero di

---

(1) Camus. Si è occupato di questa questione in tre memorie: I. *Recherches sur l'immunité vaccinale de l'action antivirulente des humeurs des animaux vaccinés, ses variations, ses relations avec l'action bactéricide*. Journ. de Phys. et Path. gén., 1908, T. X, p. 455; II (vedi citazione pag. 13); III. *Recherches sur l'immunité vaccinale passive et la sérothérapie*. Id. id., 1912, T. XIV, pag. 782.

(2) Henseval et Convent. *Recherches sur l'immunité vaccinale. Etude des propriétés du sérum des animaux vaccinés*. Bull. de l'Acad. r. de méd. de Belgique, 27 avril 1912.

conigli immunizzati per via cutanea, raccolto 18 giorni dopo e trovato fornito di alto potere virulicida, inoculato sottocute e nelle vene a conigli in quantità di 20-50-100 cmc. (i conigli pesavano da un minimo di kg. 1.200 a un massimo di kg. 1.480) in una sola volta, determinava una certa immunità cutanea di fronte all'inoculazione di vaccino praticata il giorno dopo.

Inoltre, osservano gli AA., introducendo il siero per via endovenosa o endoperitoneale, ne basta la metà circa di quella che è necessaria per produrre fatti immunitari per la via sottocutanea.

Col siero di coniglio ricavato 19 giorni dopo l'inoculazione cutanea di vaccino attivo, dotato di forte potere antivirulento, trattarono poi diversi conigli piccoli (di 800 a 1000 gr. salvo uno) nei quali avevano precedentemente inoculato sulla cute vaccino attivo di nota virulenza. La quantità di siero inoculato variò da 60 a 150 cmc. Leggendo i diari si deduce che fino a che l'iniezione è stata praticata da 6 a 24 ore dopo la vaccinazione, si è avuta un'efflorescenza abortiva, ridotta; quando invece veniva praticata dopo 48 ore, la vaccinazione sortiva lo stesso esito o quasi che nei controlli.

Perciò gli AA. hanno ritenuto che il siero dei conigli vaccinati possieda certe proprietà curative verso il vaccino inoculato sulla cute, a condizione che detto siero sia inoculato in quantità notevolmente grande e qualche tempo prima dell'apparizione della eruzione.

Dalle ricerche del Teissier e Marie (1), le quali sono state fatte con siero di vaiolosi, emergono importanti dati sull'azione immunizzante del siero dei vaiolosi stessi, ai quali avevano già contribuito altri (2), come successivamente contribuirono ancora i due autori su citati insieme al Gastinel.

Teissier e Marie infatti, si servirono di siero di vaiolosi raccolto al 25° e al 40° giorno dalla malattia, e lo inocularono in quantità di 25 a 100 cmc. sottocute a 13 ammalati di forme vaiolose gravi: di cui ne guarirono 8. Inoltre lo inocularono a tre bambini di cui uno di 24 giorni, guarì. In massima essi notarono che in seguito all'inoculazione del siero migliorarono i segni generali, si abbassò la temperatura, si elevò la tensione arteriosa, aumentarono le urine.

Gli stessi autori col Gastinel (3), poi, tentarono di fissare bene le basi della sieroterapia antivaiolosa, servendosi di siero raccolto da convalescenti o guariti, siero che inoculavano nelle vene dei

---

(1) Teissier et Marie. *Essais de sérothérapie variolique.* C. R. Ac. des Sciences, 9 dic. 1912, p. 1536.

(2) Viene citato da vari studiosi, tra gli altri l' Auché, 1893 (*Traité méd.*), ed è affermato che col siero sia di vaiolosi, sia di vitelle vaccinate furono trattati vaiolosi in atto, con risultati sui quali però non evvi gran che da contare. A questi studi ha contribuito il Béclère (*Essais de sérumthérapie de la variole à l'aide du sérum de génisse vaccinée.* Bull. Acad. de Soc. de méd. des Hôp. de Paris, 1895, et Congr. de méd. de Nancy, 1896).

(3) Teissier, Gastinel et Marie. *De l'immunité passive causée par les injections intraveineuses de sérum variolique.* C. R. Ac. des Sciences, 22 dicembre 1913.

conigli, praticando poco prima o subito dopo l'innesto cutaneo del vaccino.

Dalle loro indagini risulta che quando si faccia un trattamento preventivo (praticando 2-6 giorni prima dell'innesto del vaccino l'inoculazione del siero di vaiolosi) questo influenza l'evoluzione dell'efflorescenza vaccinale, facendola più o meno evidentemente abortire.

Adoperarono la dose di 6 cmc. di siero in una sola volta, quella di 3 cmc. ripetuta per 4 giorni di seguito, nonchè quella di 4 cmc. ugualmente ripetuta per 4 giorni di seguito, dose quest'ultima che parrebbe quella atta a impedire l'evoluzione dell'efflorescenza vaccinale.

Ugualmente, adoperando il siero a scopo curativo, ottennero qualche risultato se l'innesto del virus non datava da più di 48 ore prima del trattamento sieroterapico. In questa condizione notarono una attenuazione degna di nota dell'infezione vaccinica cutanea.

Di guisa che riandando la letteratura si può derivarne la conclusione *che tanto col sangue* in toto *quanto coi sieri di animali vaccinati e di individui vaiolosi, si può ottenere nei conigli un certo grado d'immunità verso l'infezione vaccinica cutanea, purchè si adoperi una quantità notevole di siero o di sangue; e, dico, un certo grado di immunità, giacchè l'immunità assoluta, la quale pur qualche volta è stata ottenuta, è chiaro essere una immunità difficilissima a raggiungersi, eccezionale a constatarsi.*

***

Esposta così sommariamente la letteratura dell'argomento di cui mi occupo nel presente lavoro, tratterò ora con i dettagli necessari delle varie questioni riferentisi all'immunità passiva nel vaccino e nel vaiolo, distinguendo il fin qui fatto da altri e da me in tre parti, concernenti: **la prima,** *l'immunità che si determina immediatamente al trattamento sieroterapico;* **la seconda,** *i fatti che dimostrano anche* **l'esistenza di un'immunità più tardiva,** *o come io la chiamo di una immunità mediata allo stesso trattamento; e la* **terza** *riguardante la portata pratica della sieroterapia.*

Faccio presente che durante lo svolgimento di queste varie parti, ho spesso dovuto addentrarmi a studiare questioni collaterali sia di tecnica, sia di concetto, senza le quali sarebbe stato impossibile intendere i fatti che espongo. Così nella compagine del lavoro è trattato della tecnica per lo studio delle proprietà virulicide, degli anticorpi, dell'adatta preparazione dell'antigeno, della questione delle sostanze virulicide leucocitarie, della coltivabilità del virus nei leucociti, della questione della resistenza del virus, della localizzazione del virus negli organi interni, delle proprietà dei virus così detti inattivati nei riguardi dell'immunità, ecc. ecc.

PARTE I.

Immunità immediata al trattamento sieroterapico.

Gli AA., che si sono occupati dell' immunità passiva nel vaccino e nel vaiolo, hanno naturalmente cercato di scoprire nei sieri le sostanze cui riferire proprietà immunitarie.

E i risultati delle *ricerche sperimentali* fin qui eseguite vi portavano ad ammettere la esistenza di sostanze virulicide e e di sensibilizzatrici.

Ma poichè a questi due gruppi di sostanze, dati sperimentali che a me sembrano di indubbio valore conducono ad aggiungerne una terza, così nel presente lavoro distinguo la trattazione delle sostanze immunizzanti in tre capitoli distinti.

Capitolo I.

Sulle sostanze virulicide dei sieri antivaccinici e antivaiolosi.

A) *Esperimenti che ne dimostrano la presenza.*

Si può dire che le ricerche sulle sostanze virulicide comincino con lo stesso Chauveau e con il Raynaud e proseguano per opera di nuovi studiosi, quali Cramer e Boyce, Landmann, Rembold, Beumer e Peiper, ecc. (1).

Seguirono le ricerche di Straus, Chambon e Ménard alle quali, specie da Janson (2) venna mossa l'obiezione della possibile esistenza del virus nel liquido immunizzante, l'esperimento non essendo condotto con tanto rigore da poter negare che il virus mancasse nel sangue, nonostante, questa obbiezione, avessero cercato di escludere vecchi sperimentatori come il Raynaud. Questi infatti fin dal 1878 aveva affermato che il sangue di vaccinati, inoculato a individui sani, non produceva mai lesioni vacciniche: ebbe su 35 casi altrettanti insuccessi anche quando il sangue veniva prelevato nelle vicinanze delle pustole. Ma il Janson la riaffermava facendo anche presente che col siero sterilizzato i risultati immunizzanti venivano a cessare.

---

(1) Tutti gli AA. per i quali non si pone citazione a piè di pagina sono già stati citati in precedenza.

(2) Janson. *Versuche zur Erlangung Künst. Imm. b. Variola-vaccine.* Centr. f. Bakt., Bd. X, pag. 40, 1891.

Intanto Béclère, Chambon e Ménard in seguito facevano notare che l'immunità si otteneva immediatamente dopo l'inoculazione del siero, ciò che permetteva, secondo loro, di escludere fosse determinata dal virus, occorrendo in questo caso 8-10 giorni per manifestarsi.

A questi studiosi si deve l'affermazione che i sieri spiegavano azione immunizzante antivirulenta, deducibile dall'insuccesso delle inoculazioni successive del virus, dal modo di presentarsi rudimentale ed abortivo dell'efflorescenza vaccinica, dalla virulenza mancata o diminuita del contenuto dell'efflorescenza nei vaccinati dopo il trattamento.

Le successive ricerche di Sternberg in collaborazione con Griffiths (1892) (1) fatte con buone basi di tecnica, di Kinyoun (1894) (2) dimostrarono che *in vitro* si poteva inattivare il virus mettendolo in contatto col siero e confermarono questa azione virulicida del siero degli animali trattati, e così quelle di Courmont e Montagard (3) col siero di vitelle vaccinate o variolizzate con materiale vaioloso raccolto a Lione nel 1909, quelle del Freyer (1904) (4) e del Riser (1905). Interessanti sono sovratutto quelle di Freyer. Questo A. studiò l'azione del siero di coniglio inoculato con linfa vaccinica, di siero di vitello vaccinato, ecc., e trovò che il vaccino si inattivava in contatto con siero di coniglio trattato con linfa vaccinica. Usando vaccino umano trovò ugualmente che veniva ad inattivarsi in contatto con siero di individui trattati con linfa vaccinica, ecc. Come pure che il siero di vitelle vaccinate non era mai fortemente virulicida come quello dei conigli. Inoculandoli per via peritoneale però l'azione virulicida si dimostrava più intensa nel rapporto di 0. 5 di siero e 1 di linfa lasciati in contatto vario tempo fino a 15-20 ore.

Da quest'epoca più o meno tutti gli studiosi accettavano il fatto che le mescolanze con linfa vaccinica di sieri di animali trattati davano luogo a pustole abortive o addirittura nulle in animali recettivi.

Le esperienze avevano infatti condotto a trovare che il sangue delle vitelle avrebbe esplicato azione immunizzante inoculato in

---

(1) Sternberg. *Practical results of bact. res.* Trans. of the Assoc. of Americ. Phys. 1892. *Wissenschaftliche Unter. ü. d. spezifische Infektionsagens d. Blättern u. d. Erzeugung Künstlicher Immunität g. diese Krankeit.* Ref. in Centr. f. Bakt., Bd. XIX.

(2) Kinyoun. *Treat of variola by its antitoxin.* The Atlantic med. Weekly, 1895. *Preliminary Report on the Treat,* etc. Abstr. of. San. Reports, Washington, X, 1894. Ref. in Hyg. Rundschau, Bd. V, p. 366.

(3) Courmont et Montagard. *Essais de sérothérapie dans la variole.* Journ. de Phys. et de Path. gén., 1902, p. 820. Ref. in Hyg. Rund., 1902, p. 139.

(4) Freyer. *Das Immunserum der Kuhpockenlymphe. Eine orientierende Experimen.* C. f. Bakt. O. I. A., 1904, Bd. XXXVI, p. 272.

dose adatta se raccolto nel termine vario da 10 a 50 giorni dalla praticata vaccinazione cutanea, e che come il siero di vitelle si comportava quello di altri animali se inoculati per altre vie. Si citano da Béclère, Chambon e Ménard i sieri di vitelli, di cavalli, d'uomo vaccinato, quelli di cavalli inoculati sottocute, nelle vene con siero di vaiolosi, i sieri di vitelli e di conigli inoculati nelle vene, i sieri di cavalli inoculati nelle vene con materiale vaioloso, il siero di scimmie vaiolose. In questi sieri l'azione virulicida comparirebbe tra il 6° e l'8° giorno dell'avvenuta inoculazioue o un po' più tardi e durerebbe un tempo variabile da pochi giorni a moltissimi anni (25 e 50 persino in un vaioloso).

La sostanza dotata di potere immunizzante virulicida resisterebbe bene alla luce, all'ammuffimento, alla putrefazione e sarebbe filtrabile attraverso le candele di porcellana, non dializzerebbe, sopporterebbe la temperatura di 70° e quella di 100° per 30 minuti, sarebbe precipitabile con solfato di ammonio e resterebbe legata alla globulina (1).

Certo le ricerche che vennero fatte in seguito non fecero che confermare l'esistenza di un potere virulicida nel sangue di vaccinati e di vaiolosi.

Le stesse esperienze di Roger e Weil (2) i quali ottennero, in seguito alle inoculazioni di siero, delle eruzioni papuliformi sulla cute, le quali dovevano naturalmente far pensare alla presenza del virus nei sieri, continuando essi a poter immunizzare i conigli, anche quando i sieri erano sforniti di qualsiasi azione locale, parlano per la esistenza di una sostanza immunizzante nei sieri stessi.

Ma poi vi sono le interessanti esperienze del Süpfle (3) al riguardo. Col siero di animali che erano stati inoculati con vaccino 10 o 15 giorni prima, per via cutanea, sottocutanea o endovenosa aggiunto a linfa glicerinata diluita con soluzione salata, l'A. fece delle mescolanze che dopo un certo tempo erano centrifugate e il deposito inoculato sulla cute di conigli albini, stroppicciata a sangue con carta vetrata.

---

(1) Si legge in qualche lavoro che Pfeiffer e Proskauer l'hanno separata a mezzo della digestione. Segnalo la cosa senza fermarmici sopra. Tale citazione è fatta anche dal Süpfle che l'ha raccolta da Prowazeck.

Aggiungo che Camus avrebbe trovata questa sostanza virulicida resistere a 72° per 5 minuti (mentre secondo Süpfle a 65-70° si distrugge). Lo stesso A. avrebbe trovato, collocando nel peritoneo di conigli vaccinati sulla cute delle candele porose contenenti acqua distillata sterile, dopo 50 giorni, che il contenuto di esse era dotato di proprietà antivirulente, le quali sarebbero legate alle sostanze albuminoidi passate attraverso i pori delle candele. (*De l'action antiv. des humeurs*, etc. Journ. de Phys. et de Path. gén., maggio 1908, p. 455.

(2) Roger et Weil. *Inoculation de la vaccine et de la variole au singe.* C. R. Soc. Biol., 1902, p. 455.

(3) Süpfle. *Die vaccine Immunität (Eine kritische und experimentelle Studie).* Arch, f. Hygiene, Bd. LXVIII, 1908.

Egli ottenne o semplici fenomeni reattivi o tipiche eruzioni pustolose o, ciò che fu il caso più frequente, fatti incerti fino al 5°-7° giorno e poi o pustole tipiche o pustole abortite.

L'A. nota che la quantità di siero che si mette in contatto con la linfa ha una importanza fondamentale per giudicare del potere virulicida: lo stesso siero che, aggiunto a 1 cmc. di linfa in quantità di 0. 5 era attivo, non lo era più in quantità di 0. 1.

Sebbene, come si desume da quanto riporta l'A., in qualche caso, egli non abbia trovato il siero virulicida, a questo fatto non pare dia, però, eccessivo peso, perchè, pur ritenendo l'azione virulicida del siero sottoposta a grandi oscillazioni, conclude col dire che nel siero di animali immunizzati si presentano anticorpi a caratteri virulicidi, la cui grande importanza per ottenere e conservare lo stato di immunità, analogamente alle sostanze battericide, è evidentissima.

Del resto a togliere ogni dubbio sulla presenza di sostanze virulicide nei sieri sopravvengono le osservazioni di Camus e di Henseval e Convent, le quali parlano decisamente in favore di questa azione virulicida del sangue.

Il Camus (1) ha sperimentato l'azione di tutti gli umori organici sul vaccino: le mescolanze le ha costantemente tenute per 1 ora e 40° e poi inoculate sulla cute dei conigli.

Ha così trovato nel sangue di coniglio un potere antivirulento energico che si conserva per più di 8 mesi e che è 25-50 volte più forte di quello del siero normale (2); il solo siero sanguigno sarebbe quello che realmente ha un potere protettore.

Inoltre partendo dal concetto che l'immunità della pelle non resta immutata, cioè che alcuni individui restano refrattari per molto tempo, e altri perdono questa immunità più o meno rapidamente, ha cercato di determinare i fattori che la condizionano, ed ha trovato che di 5 conigli vaccinati da 1 a 5 mesi prima, due, vaccinati da 3 a 5 mesi non erano completamente immunizzati pure essendo il *siero altamente antivirulento*. Per cui ne ha dedotto che non solo la immunità cutanea non si prolunga oltre la durata dell'immunità sanguigna, ma essa è di già affievolita quando il siero è ancora nettamente antivirulento.

Vi sono poi alcune esperienze del Camus che parlano decisamente in favore della importanza dell'azione virulicida dei sieri nei riguardi dell'immunità vaccinale. Egli infatti praticando inoculazioni a tutto spessore con siero immunizzante nelle cornee, dice di esser riuscito a immunizzarle e ne deduce che *l'azione regionale del siero produce più facilmente i suoi risultati* delle iniezioni fatte per altre vie.

---

(1) Camus. *Des variations de l'activité antivirulente des humeurs et de l'immunité des tissus chez les animaux vaccinés.* Journ. de Phys. et de Path. gén., 1909, T. XI, pag. 629.

(2) Il siero normale di conigli è anch'esso antivirulento, secondo le esperienze del Camus, ma lo è così poco che la sua azione è insufficiente per impedire si produca una eruzione, in seguito alla vaccinazione cutanea. Camus inoltre non ha mai trovato conigli dotati di immunità nuturale.

Sono ancora dello stesso A. le esperienze dimostranti che i conigli inoculati sulla cute con la mescolanza siero antivirulento + vaccino non determinano reazione cutanea, e quelle dimostranti come salassando ripetutamente gli animali vaccinati il siero conservi proprietà virulicide, cioè come l'organismo abbia il potere di rifare rapidamente la sostanza virulicida (1).

Quanto ad Henseval e Convent, i quali come il Camus si addentrano molto a dimostrare la importanza della sostanza antivirulenta del sangue dei vaccinati, hanno addirittura cercato di determinare la proporzione delle sostanze antivirulente nei sieri, preparando un siero immune campione secco da conigli largamente vaccinati sulla cute e determinando quale era la quantità di questo siero capace di distruggere il virus contenuto in cmc. 0. 5 di un vaccino campione (di cui si conosce l'attività secondo il metodo di Calmette e Guerin, diluito all'1 su 250), deducendo la distruzione del virus dall'azione sua su 60 cmq. sulla cute di conigli.

Le mescolanze erano tenute 1 ora a 37°. Essi ritennero distrutto il vaccino quando non si producevano pustole o se ne produceva qualcuna.

Trovarono i sieri degli animali vaccinati dotati di potere virulicida: in massima, inoltre, tale potere era più forte quando l'animale era stato inoculato con molto vaccino per la via endovenosa, e dico, in massima, perchè è anche vero che i conigli che ebbero una eruzione confluente possedevano un siero che aveva un potere antivirulento quasi analogo, per quanto non si tratti di un fatto generale.

La sostanza virulicida sarebbe comparsa, secondo Henseval e Convent in un caso al 9° giorno, in un altro al 10°, in ambedue col massimo dopo 24 ore, cioè all'11° e al 12° giorno rispettivamente; però in altri l'hanno trovata anche al 7°, con il massimo al 9.

Secondo gli AA., l'immunità della pelle comincia prima della comparsa delle sostanze virulicide nel sangue e precisamente 2 o 3 giorni prima. Si fanno perciò la domanda se la pelle costituisca uno dei centri di formazione della sostanza virulenta.

Naturalmente tra i risultati di Camus e quelli di Henseval e Convent vi sono piccole differenze sulle quali ferma l'attenzione il Camus in successive note. Così recentemente (2) conferma che la azione curativa del siero non oltrepassa la fase di incubazione, poichè trascorse 20 ore una iniezione di 20 cmc. resta senza azione. Inoltre, praticando il trattamento durante il periodo di incubazione, cioè tra 5-10 ore dell'innesto del vaccino, conferma che l'attività immunizzante più grande, dedotta dall'attenuazione maggiore dell'eruzione, si osserva negli animali inoculati da minore tempo con vaccino. Se Henseval e Convent, dice l'A., hanno potuto influenzare l'eruzione fino a 48 ore prima dell'innesto del virus, coll'inoculazione dei sieri immunizzanti, ciò si deve alla dose più considerevole di siero inoculato (sino a 100 cmc. per chilogrammo di peso di animale).

---

(1) Camus. *Immunisation vaccinale passive et sérothérapie*. C. R. Ac. de Sciences, 1912. *De la valeur de l'immunité vaccinale passive*. Id. ib., 1912.

(2) Camus. *De l'action curative du serum virulicide*. C. R. Soc. Biol., 1912, T. II, pag. 294.

Non bisogna però ritenere che i conigli trattati coi sieri, i quali conigli hanno reagito con pustolosi abortiva o limitata, presentino una forte immunità, giacchè gli AA. hanno trovato che i conigli che avevano reagito con poche pustole, 20-22, inoculati dopo 1 mese erano ancora recettivi. Ritengono come Kelsch (1) che la quantità del vaccino inoculato abbia una influenza notevole nel determinare il grado e la solidità della immunità.

Io non posso che confermare la esistenza di queste proprietà virulicide nei sieri tanto dei cani che dei conigli trattati, i primi con vaiolo bovino e vaiolo umano, i secondi con vaiolo bovino.

E poichè nel contesto del presente lavoro sono riportati molti esperimenti che lo dimostrano (2), non li riporto in particolare in questa parte del lavoro.

Mi limiterò semplicemente ad aggiungere che per la metodica ho seguìto una tecnica simile a quelle usate da altri studiosi, cercando di mettermi al coperto di qualche causa di errore che mi sembrava persistere in alcuna di esse, senza per altro aver con questo creduto di averle evitate tutte.

Quindi, quando parlo di proprietà virulicide dei sieri, intendo quelle che si rilevano dai risultati abortivi o nulli della reazione cutanea seguente all'innesto sulla cute dei conigli, delle mescolanze di siero, di cui si studiano dette proprietà, con vaccino (nei rapporti di 1 di siero ad 1 di vaccino), mescolanze tenute a + 4° per 12 ore).

Non ho seguìto la tecnica di centrifugare le mescolanze ed inoculare soltanto il deposito, perchè del virus in quantità ne resta sospeso nel liquido ed eliminando poi il siero si elimina del virus.

Non ho seguìto la tecnica di porre la mescolanza a 37° o a 40° come hanno fatto altri AA., perchè queste temperature non sono favorevoli alla virulenza del virus in mezzi liquidi.

Ho inoltre avuto molta cura nel procurarmi il virus in tali condizioni da poter avere un materiale finamente suddiviso, seguendo in ciò la tecnica usata e già più volte descritta per ottenere il virus filtrabile. Le sospensioni del virus erano appena opalescenti e private sempre per centrifugazione del materiale corpuscolare eventualmente rimasto sospeso.

Naturalmente il virus vaccinico veniva diluito con acqua salata al 0.85 % (partendo da un gr. di vaccino del commercio, glicerinato, lavato su candele porose e dopo lavato, determinatane

---

(1) Bul. de l'Acad. de Méd. Paris, 1906 (citato da Henseval e Convent).

(2) Vedi in proposito, per esempio, nella Parte I, il Cap. III e nella Parte II, il Cap. I (tabelle a pag. 31 e 52).

la quantità) 1 : 250, 1 : 500, 1 : 1000, ecc., e saggiatane la virulenza sulla cute dei conigli depilata, stropicciandola con carta vetrata.

Adoperavo la stessa quantità di vaccino corrispondente a quella messa in contatto col siero, aggiunta con Na Cl al 0.85 % sterile quanto era necessario per portarlo allo stesso volume delle mescolanze del vaccino col siero.

Con il materiale poi, operavo in modo da coprire tutta la superficie rasa di cui si notava la superficie in cmq. Naturalmente si contavano le pustole che si sviluppavano in 4ª-5ª giornata e si facevano i voluti raffronti tra il numero di quelle che si sviluppavano nei conigli sui quali si faceva l'innesto del virus trattato con siero e il numero di quelle che si sviluppavano nei controlli.

B) *Genesi delle sostanze virulicide.*

Data l'esistenza di proprietà virulicide nel sangue, la questione che mi occupò fu quella dell'origine di queste sostanze virulicide, ciò che non era stato fatto da alcun studioso.

Confesso che per molto tempo sono rimasto nel dubbio che esse potessero avere la stessa natura delle sensibilizzatrici, anzi che fossero la stessa cosa; in seguito, specialmente attesa la loro resistenza alla temperatura (poichè esse resistono a 75° per 1 h). e la difficoltà di elevarne di molto il tenore nel siero, sono passato ad altro ordine di idee.

E precisamente, considerando che nel siero dette sostanze virulicide compaiono tardivamente e mettendo questo fatto in relazione con gli studi che sono stati eseguiti sull' intervento dei leucociti nella lesione vaccinica e vaiolosa, mi è sembrata avere trovata la via per spiegarne la genesi.

Intanto è certo che la cute degli animali sensibili è già immunizzata quando di sostanze virulicide in circolo non se ne trovano, e Camus ed Henseval e Convent l' hanno notato : come è certo che l' invasione leucocitaria, nella lesione vaccinale e vaiolosa è tardiva.

Tutti gli AA. che hanno studiato da vicino il modo di comportarsi dei leucociti nella lesione o cutanea o corneale sono venuti a questa conclusione.

Citerò l'A. che più degli altri si è occupato dell' intervento dei leucociti nel vaccino, il London (1).

---

(1) E. S. London. *Des corpuscules de Guarnieri.* Journal russe d'hygiène publique, 1896, n. 6, p. 139. Citato da Sicorsky. *De la nature des corpuscules de Guarnieri.* Archiv. de Sc. Biol. Pétersburg, 1902.

Egli dice: « In seguito all' inoculazione del vaccino nella cornea « i corpuscoli migranti penetrano nella parte della *substantia propria* « che aderisce all'epitelio. Qualche leucocita si dirige verso il punto « di inoculazione, qualche altro si arresta e penetra nelle cellule dello « strato profondo dell'epitelio. Arrivati al punto di inoculazione « attraverso la *substantia propria* i leucociti cominciano a pene- « trare nell'epitelio in grandissime numero. In questo stato dello « sviluppo del processo ciascuna delle cellule dello strato profondo « dell'epitelio contiene 4 o 5 leucociti. Ma dopo un certo tempo in « queste cellule non si trova che uno solo o al massimo due leuco- « citi; mentre negli strati superiori si trovano delle forme che per « il loro aspetto esteriore non si assomigliano ai leucociti situati in « altre parti della cornea. ... La loro apparizione negli strati supe- « riori dell'epitelio è seguìta dalla scomparsa dei leucociti dallo « strato profondo ».

Ma non è tutto: gli studi fatti sul modo di comportarsi dei leucociti nella lesione vaccinica e in quella vaiolosa (1) dimostrano che essi vanno soggetti a evidenti e chiari fenomeni di autolisi.

Continuando a citare lo stesso London, ecco che cosa egli scrive:

« I corpuscoli migratori mono e polinucleati insinuandosi fra « gli elementi della *substantia propria* perdono tutto ad un tratto i « loro corpi cellulari e se ne liberano a tal punto, che è impossi- « bile di metterli in evidenza con colorazioni, tuttavia qualche leu- « cocita polinucleare conserva il suo corpo cellulare quando si di- « scopre nelle cellule dello strato profondo dell'epitelio corneale.

« I nuclei dei corpuscoli migratori cominciano a presentare » delle alterazioni nella loro struttura soprattutto quando i leuco- « citi penetrano negli strati più superficiali dell'epitelio. Prima di « tutto si vede la sostanza cromatica che si colora in verde (mi- « scela Biondi-Haindehain) distinguersi dalla sostanza detta acro- « matica e che si colora in queste soluzioni in rosso. Il succo nu- « cleare fa evidentemente parte di questa cromatina. Forse la « porzione del corpo cellulare che aderisce immediatamente al nucleo « è rimasta intatta e si colora egualmente in rosso... La trasfor- « mazione ulteriore si traduce in questo, che la cromatina verde « si accumula nella parte centrale dell'elemento sotto forma di un « grano allungato omogeneo, ecc. Il leucocita polinucleare in questo « stato di necrobiosi appare egualmente sotto forma di un corpo « rosso con due o tre granulazioni verdi rotonde ed omogenee... « La fase ultima della disgregazione dei corpuscoli è caratterizzata « dalla formazione, a spese della cromatina dei loro nuclei, di gra- « nulazioni rotonde, omogenee, di dimensioni variabili, che si colo- « rano in verde » (2).

---

(1) KAMMERER. *Ueber d. Leukocytenbild b. Variola.* D. Arch. f. Klin. Med., 1910, p. 354.

(2) Forse il LONDON confonde coi leucociti anche i reperti cellulari così bene studiati dal TANON, sui quali occorrerebbe fissare l'attenzione più di quello che non sia stato fatto sinora.

Si tratta di elementi cellulari che compaiono anch'essi tardivamente,

È quindi indubbio l'intervento, per quanto tardivo, dei leucociti nelle lesioni vacciniche e la partecipazione di essi ai fenomeni di autolisi cui soggiacciono le cellule del focolaio infetto.

Era quindi logico pensare che le sostanze virulicide potessero avere una origine leucocitaria.

A questo proposito ricorderò che le discussioni sulla origine leucocitaria delle sostanze battericide dei sieri, per quanto ancora aperte, approdano ad ammettere, in base a dati sperimentali, che i globuli bianchi siano dotati di un potere battericida dovuto a leucolisine che alcuni vorrebbero anche fossero *unum et idem* col complemento, ciò che non è provato.

Io non starò a riportare la letteratura al riguardo, la quale è stata così bene e obbiettivamente da poco riassunta e commentata dal Levaditi (1). Non posso però a meno di far presente che quando mi accinsi a queste ricerche, rimasi molto colpito da due gruppi di esperienze eseguite sui batteri dal Petersson.

Dal primo risultava che inoculando a delle cavie dei leucociti di cavie, dai quali non si possono ricavare sostanze battericide per uno stipite di vibrione di Metschnikoff o per il vibrione del colera (2), in seguito a questa inoculazione aumentava la fagocitosi nel peritoneo. Si noti che gli animali erano in precedenza inoculati con dosi più volte mortali di vibrioni insieme a siero specifico e gli animali sopravvivevano, mentre i controlli morivano.

Dal secondo si ricavava che sperimentando coi globuli bianchi di animali inoculati con carbonchio e con vibrione del colera (3), allorchè i conigli erano inoculati per via endovenosa con leucociti immuni e una determinata quantità di virus non si avverava la

---

cioè quando il processo vaccinico e vaioloso arriva al suo acme, quando la vescicola si trasforma in pustola. Essi proverrebbero dal tessuto cellulare sottocutaneo, loro sede normale. Si tratterebbe di cellule sul tipo delle Mastzellen, che prima di divenire migratrici sembrerebbero passare per la forma di clasmatociti.

Secondo l'A. forse hanno importanza nei fenomeni di difesa, ma si tratta di un semplice sospetto. (*Sur la présence de cellules à granulations métachromatiques dans la pulpe vaccinale.* Journ. de Phys. et de Path., gen. luglio 1909).

(1) Levaditi. *Les bacthériolysines leucocitaires dans leurs rapports avec l'alexine.* Bull. de l'Inst. Pasteur, T. XII, 1914, n. 11, 12, 13.

(2) Petersson. *Die Rolle d. Leukocyten im Kampfe des Tierorganismus, etc.* Centr. f. Bakt., I., O , Bd. XLII, p. 56, 1906.

(3) Petersson. *Weit Unt. d. Bed., d. Leucocyten f. d. Immunität.* Centr. f. Bakt., I. A. O., Bd., XLV, p. 160. Vedi anche *Ueber d. Wirkung d. Leucocyten b. intraperitonealer Cholerainfection d. Meerschweinchens.* Id. ib., Bd. L, p. 650, 1909.

morte degli animali, l'esperimento riusciva meglio in seguito al trattamento coi leucociti immuni che in seguito a quello coi leucociti normali. Che l'azione fosse dovuta ai soli leucociti era indubbio, dacchè la inoculazione degli stessi veniva fatta dopo che erano stati lavati.

Si tratta di esperienze che sono state poi avvalorate da altre del Salimbeni (1) dalle quali risulta che i leucociti ricavati dal peritoneo di una cavia vaccinata, possiedono, come riassume bene Levaditi, « un potere preventivo manifesto, potere che non sorpassa quello del siero semplice o del siero aggiunto con globuli bianchi di cavie nuove. Inoltre se si paragonano le proprietà preventive dei leucociti lavati, del siero e delle acque di lavaggio, si constata che solo i leucociti sono attivi ».

Per mio conto, sperimentando con vaccino, ho assodato un certo aumento del potere virulicida nel siero dei conigli trattati con leucociti normali e più forte col siero di conigli trattati con leucociti immuni, sempre autolizzati, (ottenuti da conigli da 18 giorni inoculati con vaccino sulla cute e realmente immuni, giacchè dopo ricavatine i leucociti, inoculati sulla cute con vaccino attivo il risultato dell'innesto del virus fu negativo).

Ecco alcuni esperimenti:

Animali inoculati nelle vene con 1 cmc. di autolizzato di leucociti	Numero delle pustole provocate sulla cute dei conigli dalle mescolanze del siero e del virus diluito 1:250	Controlli — Inoculati sulla cute col solo vaccino diluito 1:250 con Na Cl al 0,85 %
1° coniglio (autolizzato di leucociti normali).	236	1° coniglio: pustole 542
2° coniglio (autolizzato di leucociti normali).	327	
3° coniglio (autolizzato di leucociti immuni).	64	2° coniglio pustole 300
4° coniglio (autolizzato di leucociti immuni).	52	

N. B. — Ho adoperato per ottenere l'autolizzato di leucociti 1 cmc. di leucociti raccolti dal peritoneo (in seguito ad inoculazione di aleuronato sterile) in miscela citrosodica, deducendo la quantità di leucociti dal deposito delle provette da centrifuga. L'autolizzato l'ho ricavato dalla mescolanza di leucociti, cmc. 1 con 10, di Na Cl al 0,85%, tenuta a 40° per 8 giorni sbattendola 4-5 ore al giorno. Quando dico 1 cmc. di leucociti inoculati intendo quindi tutti e 10 i cmc. dell'autolizzato.

Aggiungo che nell'esperimento eseguito coll'autolizzato dei leucociti immuni si potrebbe obbiettare esser presente il virus: pur non escludendolo, è certo che ciò non altera i risultati ben tangibili dell'esperimento stesso.

(1) SALIMBENI. *Modif. des globules blanc dans l'imm. acquise.* Ann. Instit. Pasteur, 1909, p. 558.

Le sostanze virulicide del siero degli animali immunizzati verso il vaccino paiono dunque aumentare col trattamento a mezzo dell'autolizzato di leucociti e specialmente se questi provengono da animali immuni.

Ciò mi ha fatto nascere il dubbio che le sostanze dei leucociti che così si comportavano fossero rappresentate dal complemento. Perciò ho ripetuto alcune ricerche con sieri riscaldati.

Qui conviene tener presente che la resistenza delle batteriolisine leucocitarie alla temperatura è stata dimostrata essere, di solito, superiore a 60°, e precisamente intorno a 80°; si tratterebbe cioè di sostanze termostabili.

Ora, io ho riscaldato gli autolizzati di leucociti a 75° ed ho ottenuto risultati paragonabili a quelli già riferiti, cioè una inibizione parziale della pustolosi cutanea, ciò che confermerebbe la termostabilità di tali sostanze.

Ecco alcuni esperimenti:

Animali inocu'ati	Numero di pustole	Controllo
1° coniglio inoculato nelle vene con 1 cmc. di autolizzato di leucociti immuni tenuto a 75°C per 1 h.	56	348
2° coniglio, idem	84	

Parmi quindi non sia lecito identificare le virulicidine leucocitarie col complemento in base al comportamento verso la temperatura.

Frattanto poichè, come abbiamo visto, il destino dei leucociti nella lesione vaccinale è l'autolisi e il momento in cui le sostanze virulicide pervenivano in circolo poteva corrispondere a quello in cui precisamente i leucociti si autolizzano, ho fatto anche delle ricerche al riguardo, tenendo presente gli studi sulla genesi delle leucolisine batteriche, le quali da alcuni si ritengono eliminate *in vivo* dai leucociti, e da altri un fenomeno postmortale.

A tale scopo sono ricorso a quelle che io chiamo colture *in vitro* del virus nei leucociti (1) ed ho trovato che nelle mescolanze di

(1) Quando parlo di colture *in vitro* intendo del vaccino tritato, filtrato attraverso Berkefeld W dopo diluizione in miscela citrosodica, con l'aggiunta di leucociti sterili di coniglio, secondo la tecnica indicata nel mio lavoro *Sulla coltivabilità del virus vaccinico nei leucociti.* (Soc. tra i cultori di sc. med. e nat. di Cagliari, seduta del 16 aprile 1910. Cfr. anche Ann. Igiene sper., Roma, 1912, pag. 765).

filtrato vaccinico con misceia citrofodica e leucociti sterili tenute a 37°, il liquido centrifugato non possiede proprietà virulicide dimostrabili se non dopo 4 giorni, ed inoltre che tali proprietà aumentano al 5°, al 7°, all'8° e persistono se si lascia a sè la coltura a 37° per circa 15 giorni.

E, corrispondentemente, nei tubi è facile constatare una notevole leucocitolisi, specie dal 4° giorno in poi. Quindi il potere virulicida che assume la miscela citrosodica parrebbe stare in relazione con la distruzione dei leucociti, cioè le leucolisine virulicide parrebbero derivarsi dall'autolisi dei leucociti.

Se le cose staranno come questi esperimenti conducono a credere sarà facile spiegase il perchè del ritardo della formazione *in vivo* delle virulicidine negli animali inoculati di vaccino e vaiolo: la comparsa in circolo di tali sostanze sarebbe, infatti, legata non solo all'accorrere dei leucociti nel punto di innesto del virus, ma alla avvenuta autolisi dei leucociti stessi.

Capitolo II.

Sulle sensibilizzatrici vacciniche e vaiolose dei sieri.

A) *Ricerche sulle sensibilizzatrici nei sieri antivaccinici e antivaiolosi.*

Assodata la presenza di sostanze virulicide nei sieri immunizzanti, il sospetto che indubbiamente doveva nascere agli studiosi, e che nacque anche a me, era quello che si trattasse di anticorpi.

E difatti il Süpfle eseguì nel 1908 una esperienza al riguardo la quale, se non condusse l'A. ad una conclusione ben netta, di per sè stessa si presentò in tali condizioni da far dubitare realmente che il potere virulicida di un siero fosse legato a degli anticorpi specifici.

Egli infatti inoculò a conigli, da un canto il sedimento di una mescolanza di siero (inattivato a 55°-60°) con della linfa, e dall'altro un sedimento proveniente da identiche mescolanze, più siero normale di conigli, ottenendo solo dall'innesto di quest'ultimo sedimento una eruzione ridottissima.

Però già al momento in cui il Süpfle pubblicava queste ricerche erano note l'alta resistenza delle sostanze virulicide alla temperatura, e le ricerche speciali dirette a mettere in evidenza, col metodo della fissazione del complemento, particolari sensibilizzatrici vacciniche e vaiolose.

La letteratura al riguardo comincia coll'Jobling (1) che sperimentò con estratto di pustole di vitella, come antigeno, e con siero di vitelle vaccinate con risultati del tutto negativi; e, continua con le mie ricerche rimontanti al maggio 1907. Esse furono eseguite con antigeno rappresentato da vaccino filtrato attraverso Berkefeld W, concentrato a bassa temperatura nel vuoto e con vaccino non filtrato accuratamente triturato (2). Seguirono quelle dello Zedda (3) che usò la stessa tecnica, fatte nel corso di alcuni esperimenti di immunizzazione di cani e di capre.

La tecnica di preparazione dell'antigeno la esposi alla fine dello stesso anno (4) con qualche dettaglio, insistendo sulla necessità di servirsi di vaccino triturato e lavato o di quello diluito in acqua distillata, filtrato, concentrato e ridotto a soluzione fisiologica.

In quell'epoca apparve il lavoro di Heller e Tomarkin (5), i quali con estratti agressinici in acqua salata ottenuti o dalla linfa fresca o dalla linfa glicerinata, non riuscirono ad ottenere alcuna prova positiva nella infezione vaccinica dei vitelli inoculati sulla cute o nelle vene. Ricerche queste le quali non mi parvero poter distruggere le positive, già da me ottenute in precedenza, e che nell'anno successivo ebbi campo di tornare a ripetere in occasione di una epidemia vaiolosa svoltasi in Tortolì (Sardegna), epidemia che studiai anche dal punto di vista etiologico, riuscendo a dimostrare per il primo che il virus del vaiolo umano è un virus filtrabile.

Infatti servendomi come antigeno sia di vaccino bovino ben lavato, pestato e centrifugato, sia di materiale pustoloso umano,

---

(1) Jobling. *The occurrence of specific immunity principles in the blood of vaccinated calves.* Journ. of exp. Med., 1906, 8, p. 707.

(2) *Sul modo di giudicare dell'acquisita immunità antivaccinale senza manifestazione pustolosa cutanea* (I nota prev.). Boll. Soc. tra i cultori di sc. med. e nat. di Cagliari, seduta del 4 maggio 1907. (II nota) Id. ib., 25 maggio 1907.

(3) Zedda. *Se l' immunità che si ottiene con l' inoculazione di vaccino filtrato attraverso le Berkefeld W sia dovuta a localizzazioni del virus o a sostanze immunizzanti dializzabili attraverso membrane collodioniche.* Rif. med., Napoli, n. 51, 1907.

(4) *Sul modo di giudicare dell' immunità antivaccinale con pus vaccinico filtrato attraverso Berkefeld W introdotto per la via endovenosa e sottocutanea.* Ann. Igiene, Roma, 1907.

(5) Heller u. Tomarkin. *Ist die Methode der Komplementbildung beim nachweis spezifischer Stoffe für Hundswut und Vaccine brauchbar?* Deut. med. Woch., p: 795, 1907.

ottenni « la fissazione del complemento di cavia nelle mescolanze di sieri di cane (a 56°) (sieri che dimostravano un potere fissatore spiccato verso il vaccino) e di emazie sensibilizzate di capra, anche usando come antigeno materiale vaioloso umano. E ancora ottenni la fissazione del complemento di cavia nelle mescolanze di siero di vaiolosi (a 56°) e di emazie sensibilizzate di capra, quando come antigeno usai il vaccino bovino » (1).

Per cui ne conclusi « che le due infezioni vaccinica e vaiolosa si comportano identicamente riguardo al fenomeno di Bordet e Gengou », alla quale conclusione, in questi ultimi tempi, è venuto anche il Gastinel (V. citaz. a pag. 25).

Nello stesso anno il Beintker (2) trovava la reazione positiva sia nei sieri di vaiolosi, servendosi come antigeno della linfa vaccinica e dell'estratto di milza di vaiolosi, sia nel siero di coniglio inoculato con questo estratto, servendosi come antigeno della linfa vaccinica.

Parvemi quindi allora, nonostante le ricerche negative dell' Heller e Tomarkin di non essere caduto in errore nei miei esperimenti precedenti, sulla possibilità di poter ottenere positiva la prova del Bordet e Gengou nel vaiolo e nel vaccino, e però in altri esperimenti eseguiti dopo, oltre che col sangue di cani, anche di agnelli, pecore, capretti, capre, maiali ed asini, continuai ad applicarla servendomi dell'antigeno come l'avevo preparato nelle ricerche del 1907, due anni prima.

E della bontà della prova rimasi così convinto da comunicare nel maggio dello stesso anno alla Società tra i Cultori di Scienze Mediche e Naturali in Cagliari (3) i risultati della medesima, indicando tutti i singoli momenti della tecnica per ottenere l'antigeno e per ovviare a tutti gli errori derivanti da una possibile fissazione non specifica del complemento, aggiungendo ancora che i risultati erano identici tanto usando l'antigeno vaccinico bovino che l' antigeno vaioloso umano.

Contemporaneamente il Sugai (4) aveva pubblicato l'esito po-

---

(1) *Sulla filtrabilità del virus vaioloso umano e sui rapporti tra questo virus e quello bovino.* Policlinico, Sez. pratica, Roma 29 marzo 1908.

(2) Beintker. *Ueber das Verhalten der Bordetschen Reaktion bei Variola.* Centr. f. Bakt., I Abt. Orig., Bd. XLVII, 17 dic. 1908, p. 500.

(3) *Sulla fissazione del complemento nel vaccino e nel vaiolo.* Boll. Soc. tra i Cultori di Sc. Med. e Nat. di Cagliari, seduta del 27 maggio 1909.

(4) Sugai. *Ueber d. Komplementbildungversuche bei Variola vera.* Centr. f. Bakt., I Abt. Orig., Bd. XLIX, 25 marzo 1909, p. 650.

sitivo di alcune sue ricerche su individui vaiolosi o vaccinati, servendosi come antigeno del contenuto delle pustole vaiolose o della polpa vaccinica semplicemente centrifugata. Di fronte alle quali ricerche nello stesso numero del Centralblatt stavano quelle del Bernbach (1) che non riusciva a ritrovare anticorpi nel siero di conigli vaccinati per via cutanea o sottocutanea, in quelli di pecore, di cavalli e cavie, e di 18 persone vaccinate e rivaccinate servendosi come antigeno della linfa vaccinica diluita. Allo stesso anno rimontano anche le esperienze del Dahm (2) e del Xilander (3): il primo dei quali ritrovava anticorpi nel siero di vaccinati servendosi come antigeno di linfa diluita di vitella; il secondo nel siero di vaiolosi servendosi come antigeno di linfa diluita in acqua salata.

Più tardi, nel 1911, il Krilloff (4) ritornava sull'argomento trovando la prova positiva nel siero di colpiti di vaiolo e vaioloide, servendosi come antigeni dell'estratto in siero fisiologico di fegato di vaioloso (1 a 5) centrifugato, e dell'estratto di pustole in acqua salata (del pari 1 a 5); gli estratti degli organi vaiolosi invece non mostrarono proprietà antigeniche.

Dopo il Krilloff le ricerche vennero riprese da Paschen e Jacobstal, da Bizzarri e Palmas e da Teissier e Gastinel. Ho anche notizie di ricerche eseguite dal Dunn che però non mi è riuscito di poter leggere in dettaglio.

Paschen e Jacobstal (5) trovarono anticorpi nel siero di conigli e di vitelli usando come antigeno linfa estratta da bambini vaiolosi diluita con siero fisiologico: però col siero di un bambino vaccinato non ottennero prove ben evidenti.

Bizzarri e Palmas (6) con la linfa vaiolosa estratta dalle pustole e con l'estratto acquoso sia delle croste fresche, sia del vaccino fresco, che usarono come antigeno, trovarono nel siero dei loro ammalati degli anticorpi.

Teissier e Gastinel (7) rinvennero nel siero degli animali e de-

---

(1) BERNBACH. *Untersuchungen über den Impfschutz mittels der Bordetscher Reaktion.* Centr. f. Bakt. I Abt., Bd. XLIX, p. 618, 25 marzo 1909.

(2) DAHM. *Serologische Untersuchungen bei Variola vera.* Centr. f. Bakt. I Abt. Orig., 1909, Bd. LI, p. 136.

(3) XILANDER. *Die Komplementbildungreaktion bei Syphilis, Impfpocken und anderen Infektionskrankeiten.* Centr. f. Bakt. I Abt. Orig., Bd. LI, 1909, p. 290.

(4) KRILOFF. *Ueber d. Komplementbildungsreaktion bei der Varioloid und der Variola vera.* Centr. f. Bakt. I Abt. Orig., Bd. LX, 1° nov. 1911, p. 651.

(5) PASCHEN u. JACOBSTAL. *Ueber den Erreger der Variola-vaccine. Immunitätsverhältnisse bei Variolavaccine.* KRAUS und LEVADITI. *Hand. d. Technik und Methodick d. Immunitätsforschung.* 1911.

(6) BIZZARRI e PALMAS. *Ricerche sulla fissazione del complemento nel vaiolo.* Pathologica, Genova, 1911, p. 668.

(7) TEISSIER et GASTINEL. *Les réactions humorales dans la vaccine humaine ou expérimentale et dans la variole.* Revue int. de la vaccine. Tours, 1913, n. 5, p. 353.

gli individui vaccinati la presenza di sensibilizzatrici col metodo della fissazione del complemento.

Dunn (1) ottenne la deviazione del complemento col siero di vitella vaccinata, anche se il siero era filtrato, in presenza di vaccino glicerinato. Risultati incerti ottenne col vaccino filtrato, negativi col vaccino riscaldato a 100°.

Gastinel (V. citazione pag. 25) si servì di polpa vaccinica fresca tritutata in mortaio, diluita all'1 : 50 con siero fisiologico, tenuta in ghiacciaia per ½-1 ora e poi immediatamente centrifugata per ottenere un liquido appena opalescente. Con questo antigeno egli riuscì ad ottenere la fissazione del complemento.

Nello stesso modo si comportò l'antigeno vaioloso che egli ha ottenuto con la stessa tecnica ricorrendo sia alla linfa sia alle croste di vaiolosi.

Recentemente poi in un lavoro che ho inviato all'Istituto Pasteur per il volume che si pubblicherà in onore del prof. Metschnikoff (2) ho particolarmente insistito sui dati tecnici da seguire perchè la prova riesca probativa. Fissai sovratutto la mia attenzione sulle preparazioni dell' antigeno, avendo potuto assodare che il metodo di conservazione del materiale da cui ricavare l'antigeno, quello seguìto nelle triturazioni, e la diluizione, hanno grande importanza. Riporto quanto ho scritto al proposito a maggiore intelligenza del lettore:

1°. A parità di condizioni fra un vaccino conservato in glicerina in cui la glicerina venga lasciata, e lo stesso vaccino debitamente lavato, l'antigeno che si ottiene da quest'ultimo fissa più costantemente il complemento dell'altro.

2°. Non v'ha dubbio che il virus vaccinico conservato in glicerina, ove la glicerina non venga separata dal virus, fa sì che il liquido antigenico, che si ottiene facendo un estratto in acqua salata, sia poco adatto alla prova del Bordet e Gengou.

3°. Ancora: per ottenere una buona triturazione del vaccino ove si ricorra a pestare il materiale pustoloso con quarzo, allorchè si raggiunge il massimo di perfezione nella triturazione del materiale, il liquido antigenico assume proprietà di assorbire il complemento in grado elevato; ma ciò è dovuto alla presenza della silice che resta in sospensione come è già stato dimostrato in altro ordine di ricerche da altri studiosi. Il fenomeno si osserva anzi,

---

(1) DUNN. *Note on complement deviation in the serum of vaccinated calves.* Indian med. Gaz., T. 47, p. 104. (Citazione ricavata da VOIGT. *Rev. Int. Vaccine.* Vol. IV, p. 29).

(2) Il lavoro ha per titolo: *L'antigeno per la prova della fissazione del complemento nell'infezione vaccinica e vaiolosa.*

anche indipendentemente dalla presenza del quarzo, quando la triturazione si faccia in mortaio di porcellana rugosa, per la presenza del caolino che si stacca dal mortaio e che si comporta nello stesso modo.

Di qui la necessità di privare la polpa vaccinica da cui si deve estrarre l'antigeno, della glicerina, e l'altra di condurre la triturazione in mortaio d'agata o in mortaio di porcellana a superficie liscia e senza aggiunta di quarzo.

4°. Quanto alla diluizione dell'antigeno, ho notato che ove essa si faccia, sempre ben inteso con siero fisiologico in guisa da ottenere poi con una successiva centrifugazione il liquido appena appena opalescente, il più delle volte, l'antigeno che ne risulta non risponde allo scopo, per cui bisogna contentarsi di una debole diluizione che non può a meno di accompagnarsi ad una per lo meno discreta opalescenza del mezzo. Ora questo non è certo un buon carattere per un antigeno essendo presumibile che rimangano in sospensione dei materiali i quali assorbino di per se stessi non specificamente il complemento. Su questo fatto è stata fermata del resto l'attenzione anche da uno degli studiosi della prova del Bordet e Gengou, nell'infezione vaccinica, dal Bernbach.

Nei numerosi controlli da me istituiti con estratto di cute precedentemente irritata, estratti di pus, ho notato infatti che questi estratti, anche centrifugati, ma poco diluiti, in modo da rimanere il mezzo fortemente opalescente, avevano un certo potere assorbente sul complemento di cavia e si badi che non si trattava di materiale contenente il virus.

Di qui la necessità di ottenere un estratto del materiale vaccinico in acqua salata, in tali condizioni da aversi un antigeno nè troppo diluito, nè troppo concentrato, risultato che non si poteva a mio avviso raggiungere altro che partendo da una determinata quantità pesata di vaccino diluito entro limiti stabiliti.

Ed ecco la metodica scelta che comunicai per lettera al dottor Gastinel (V. pag. 63 del lavoro *Des réactions d'infections et d'immunité*, ecc., citato pag. 25), e che consiste nel diluire il contenuto pesato di un tubo del vaccino del commercio (in acqua salata al 0.85 %) nelle proporzioni di 1 a 50, centrifugarlo tre volte successivamente ricambiando l'acqua salata, triturare il deposito così lavato in mortaio, e aggiungere nuova acqua salata fino ad ottenere una diluizione di 1 a 20 ; centrifugare infine sino ad avere un liquido appena opalescente.

Da poco poi ho comunicato la preparazione di un nuovo anti-

geno (V. citato lavoro nel vol. in omaggio al prof. Metschnikoff) cioè all'antigeno, polpa vaccinica preparata nel modo anzidetto, sostituisco leucociti sterili di conigli lasciati per 8 giorni nel filtrato di virus vaccinico ottenuto attraverso le Berkefeld W, filtrato proveniente da vaccino debitamente tritato, diluito opportunamente in miscela citrosodica. Nei leucociti così preparati, a mio avviso si hanno molti dati probativi per ammettere che il virus passato attraverso le candele, si coltivi.

Questo antigeno dà risultati più costanti di tutti gli altri ed offre i seguenti vantaggi: è costituito dal virus indovato in elementi cellulari senza la presenza di altri esseri viventi che si sviluppino più o meno rigogliosamente; contiene il virus vivo e virulento ciò che si dimostra innestandolo sulla cute dei conigli e sulla cornea degli stessi; permette di poter eseguire dei controlli con antigeni ricavati dallo stesso materiale corpuscolare senza la presenza di germi.

B) *Comparsa e durata delle sensibilizzatrici in circolo.*

Già dall'esposizione della letteratura, che ho fatta pensatamente, con qualche dettaglio, risulta chiaro che di fronte ai risultati negativi di qualche A. sulla presenza di anticorpi nel siero degli animali immunizzati, ne stanno molti positivi.

Aggiungerò ora che le mie ricerche già rese di pubblica ragione mi hanno permesso di metterli in evidenza nel siero di conigli, di capre, di pecore e di asini ripetutamente inoculati per via sottocutanea con vaccino bovino filtrato attraverso candele porose che non lasciavano passare che il solo virus.

Aggiungerò anzi, benchè mi risaltasse il fatto la loro comparsa non costituisse un indice della immunità di tutti i tessuti, che rimasi così impressionato dal rapporto tra la loro presenza e il momento della comparsa della immunità cutanea, da sorgermi il dubbio che il potere immunizzante dei sieri fosse legato ad essi.

A tal'uopo ho eseguito un gruppo di esperienze col siero di conigli immunizzati, per via endovenosa, mediante virus vaccinico filtrato attraverso candele Berkefeld W.

Questo siero era dotato di proprietà virulicide assai spiccate e presentava anche degli anticorpi circolanti, dopo l'ultima inoculazione che era stata fatta 8 giorni prima dell'innesto del vaccino sulla cute.

Inoculando 20 cmc. di siero di questo coniglio nelle vene di

un coniglio sano e, trascorse 5 ore, inoculandogli il virus vaccinico sulla cute, ottenni una pustolosi limitata ed abortiva.

Dopo trascorsi 21 giorni e risalassato l'animale il siero continuò a mostrarsi virulicida, ma fu impossibile dimostrare nello stesso la presenza di anticorpi: eppure, inoculato nella dose di 25 cmc. in un coniglio sano, continuò a mostrarsi fornito di proprietà immunizzanti, dacchè il coniglio trattato inoculato dopo 14 ore sulla cute presentò una pustolosi ridotta, decisamente abortiva.

In altri termini, gli anticorpi scompaiono piuttosto presto dal circolo degli animali immunizzati mentre persistono le proprietà virulicide (Vedi a pag. 52 esperimenti dai quali emerge che ne ho trovati nei conigli fino al 39° e nei cani fino al 43° giorno).

Tale è precisamente la conclusione a cui è venuto recentemente il Gastinel (1). Questi infatti ha dimostrato che negli animali possono già trovarsi al 5° giorno dell'avvenuta vaccinazione e scomparire in una diecina di giorni dalla manifestazione pustolosa: nei vaiolosi essi si trovano a coincidere colla formazione delle vescicopustole attenuandosi fino a scomparire nella desquamazione.

Sperimentando insieme al Teissier (2) avrebbe anche notato che il potere virulicida appare nel siero più presto dopo la vaccinazione epidermica (6-7-10 giorni) che dopo la vaccinazione non

---

(1) Il lavoro del Gastinel (*Des réactions d'infection et d'immunité dans la vaccine et la variole.* Paris, Stheineil, édit. 1913), merita una profonda attenzione. In esso egli si è occupato della questione degli anticorpi nel vaccino e nel vaiolo sulla quale egli aveva già fermata l'attenzione in lavori precedenti in collaborazione con altri studiosi. Ricerca questi anticorpi negli animali vaccinati sulla cute e per altre vie, quali la sottocutanea, la endovenosa, la digestiva, la peritoneale. Inoltre li ricerca negli organi.

Analoghe indagini pratica in rapporto all'esistenza delle sostanze virulicide nel sangue di questi animali e di individui vaccinati e di vaiolosi. Infine si occupa della questione dell'immunità passiva.

Le conclusioni dell'A. sono queste. Il siero di animali vaccinati per via cutanea o no presenta delle nuove proprietà caratterizzate dalla presenza di sensibilizzatrici che deviano il complemento di fronte all'antigeno vaccinico e vaioloso e dalla presenza nel siero di un potere neutralizzante di fronte al vaccino.

Le reazione di fissazione è precoce e rappresenterebbe la prova dello stato attuale di infezione. L'azione antivirulenta del siero sarebbe più tardiva, si prolungherebbe per molto tempo, e non sarebbe in funzione della ricchezza in sensibilizzatrici: risponderebbe al periodo di immunità o meglio di allergia. Le stesse proprietà si ritroverebbero, e cogli stessi caratteri, nel siero di vaiolosi.

(2) Teissier et Gastinel. *Les réactions humorales dans la vaccine humaine ou expér. et dans la variole.* C. R. Ac. des Sciences. 2 dic. 1912. V. anche Teissier, Duvoir et Gastinel. C. R. Soc. Biol., 13 luglio 1912, e Teissier et Gastinel. Id. ib., 27 luglio 1912.

tegumentaria (18-25 giorni) e che le sensibilizzatrici appaiono nel vaccino verso il 7°-10° giorno; inoltre, mentre la durata delle sostanze virulicide sarebbe difficile a precisare, quella delle sensibilizzatrici sarebbe breve, circa 15 giorni dalla vaccinazione e nei vaiolosi (39 casi studiati) fin verso il 30° giorno.

C) *Specificità delle sensibilizzatrici nei sieri antivaccinici e antivaiolosi.*

Abbiamo dunque accertato nel siero degli animali infetti di vaccino e di vaiolo la presenza di anticorpi, i quali stanno indubbiamente in rapporto col virus dacchè non è possibile ottenere la prova del Bordet e Gengou positiva senza la sua presenza.

Che si tratti però di sensibilizzatrici provocate soltanto dall'antigene-virus, non può derivarsi dalle esperienze citate, senza sottoporle a severa critica.

Faccio notare che fin dal 1908 (1), allorchè al Congresso dei Patologi di Palermo comunicai che nello studiare i rapporti tra virus vaioloso umano e bovino per mezzo della prova della fissazione del complemento era venuto alla conclusione che gli anticorpi esistenti nel siero dei vaiolosi e nel siero degli animali vaccinati verso il vaccino bovino, si comportavano identicamente verso l'antigeno vaiolo e verso l'antigeno vaccino, alla osservazione del Rossi sull'importanza della prova, risposi testualmente che il fenomeno della deviazione del complemento, in questo caso, dati i controlli fatti sostituendo all'antigeno vaccinico, estratto di pelle, di pus, parlava in favore della presenza del virus nei filtrati. Ben s'intende però, aggiunsi, che da sola questa prova non avrebbe un valore deciso.

Così, fin dal 1908, nonostante il grande valore che davo alla prova del Bordet e Gengou per dimostrare la presenza del virus nei filtrati, non attribuii ad essa una importanza decisiva ed unica.

In seguito ho fatto delle osservazioni che meritano di essere rese note.

Anzitutto farò notare che tra un antigeno preparato da linfa vaccinica del commercio ed un antigeno preparato da linfa vaccinica fresca sonvi notevoli differenze, poichè da quest'ultimo si ottiene un antigeno a risultati più costanti e più sicuri.

---

(1) *Sull'etiologia del vaiolo umano.* V Congr. Soc. di Patologia, Palermo, 13 aprile 1908. Atti Soc. Italiana di Patologia, Palermo, 1908, p. 56 e 62.

Nella probabilità che in tale azione avesse importanza la quantità del virus e la sua virulenza ho eseguite alcune ricerche che ho esposto nel citato lavoro in omaggio al prof. Metschnikoff.

Servendomi della prova del Calmette e Guerin ho intanto constatato che in nessun caso si riesce a dimostrare un quantitativo identico di virus nell'estratto. Mantenendo in ghiacciaia gli antigeni e, dopo eseguita la prova del Calmette e Guerin, diluendo quelli più ricchi di virus fino a portarli ad una diluizione tale che si possa avere ancora una eruzione confluente, interessante tutta la superficie della pelle, e concentrando d'altro canto nel vuoto a bassa temperatura tutti quelli che permettevano, adoperati tal quale, di ottenere delle pustole separate l'una dall'altra, seminando la medesima quantità di estratto, non sono con tutto questo riuscito ad ottenere liquidi antigenici che si comportassero nell' identico modo.

Le esperienze mi hanno soltanto condotto ad accertare che, a parità di volume, gli antigeni più ricchi di virus sono migliori di quelli meno ricchi di virus.

La quantità quindi del virus esistente nell'antigeno ha un'importanza indubbia (1).

Quanto all'importanza della virulenza del virus nell' antigeno, è certo che le prove eseguite per verificare il quantitativo del virus nei dosaggi alla Calmette-Guerin dimostravano che gli antigeni adoperati lo contenevano in tali condizioni da produrre una pustolosi confluente sulla cute dei conigli e conducevano ad ammettere che negli antigeni da me preparati il virus vi si trovasse vitale e virulento.

Ma quando, come ho già detto, e come aveva fatto il Gastinel, invece di ricorrere al vaccino del commercio, mi sono rivolto al vaccino fresco, non conservato con la glicerina, e ho ripetuto le stesse ricerche, ho dovuto convenire che gli antigeni i quali si ricavavano da questi vaccini freschi, possedevano proprietà antigeniche più fisse, tanto da poter contare su di essi per le prove del Bordet e Gengou, quasi senza incertezze.

Per cui oltre che la quantità del virus nella buona preparazione dell'antigeno parrebbero avere importanza anche la vitalità

---

(1) Faccio notare che fin dal 1907 la quantità di virus esistente nell'antigeno mi parve avere importanza nella prova del Bordet e Gengou, giacchè allora servendomi di vaccino filtrato attraverso le Berkefeld W, diluito e concentrato, gli esperimenti mi erano riusciti positivi solo col concentrato.

e la virulenza del virus o per lo meno la condizione di recente coltura.

Ed è appunto in questa considerazione che tentai di ricavare l'antigeno dai leucociti nei quali il virus, *iu vitro* era stato inglobato.

Però a ben considerare il momento in cui i leucociti si presentano più adatti per ricavare da essi l'antigeno ed anche le condizioni di temperatura a cui vanno posti i tubi contenenti leucociti e virus filtrati, emerge che occorrano almeno 8 giorni dall'innesto dei leucociti nel filtrato, mantenendo le sospensioni a 37°.

Ora risulta dalle mie indagini microscopiche che a questa temperatura i leucociti al termine di una settimana vanno in gran parte soggetti a fenomeni di autolisi, come abbiamo già veduto studiando la genesi delle sostanze virulicide di origine leucocitaria.

Mi è nato quindi il dubbio che l'azione antigenica dell'estratto della polpa vaccinica o dei leucociti infetti fosse dovuta a qualche altra sostanza che si formi durante i fenomeni di autolisi cellulare.

Rifacendo però gli stessi esperimenti usando leucociti normali autolizzati per tempi diversi e estratto di cute sana autolizzata ugualmente per tempi diversi, non mi è, riuscito di ottenere un antigeno il quale nelle stesse dosi di cmc. 1-1 ½ potesse adoperarsi per la prova della deviazione del complemento.

Questi estratti anche in dose di 3 cmc. non assorbono complemento; solo, oltre questa dose, si hanno dei fenomeni di assorbimento deboli, saltuari, incostanti, specie con gli autolizzati di leucociti di 15-20 giorni e con quelli di cute di 32-45 giorni.

E però in conclusione io ritengo che *gli anticorpi dimostrati colla prova del Bordet e Gengou nel siero degli animali e dell'uomo siano rappresentati da vere sensibilizzatrici vacciniche e vaiolose*: soltanto non escludo che a favorire l'azione antigenica dell'estratto possono influire i prodotti di autolisi cellulare, i quali indubbiamente esistono e provocano, come vedremo nel capitolo successivo, la formazione di particolari anticorpi secondari i quali si possano ritrovare in circolo, senza che ciò venga a togliere importanza specifica alla suddetta prova del Bordet e Gengou (1).

---

(1) Questa conclusione sembra lasciare insoluto il quesito se la sostanza antigenica sia rappresentata dal solo virus oppure da una sostanza formantesi nelle cellule sotto l'azione del virus, agente specificamente da antigeno. Come vedremo nel capitolo seguente evvi realmente una sostanza che si può ricavare dalle cellule infette, formatasi sotto l'azione del virus, la quale nel sangue determina pure la produzione di anticorpi, ma essa

Cap. III.

Studi sopra una nuova sostanza immunizzante che si produce nelle cellule infette e sul corrispondente anticorpo nei sieri.

A) *Ricerche che dimostrano la presenza di altre sostanze immunizzanti persistenti nei sieri, oltre le sostanze virulicide.*

Già dalle ricerche di Béclère, Chambon e Ménard risultava che le sostanze virulicide si potevano mettere in evidenza nei sieri per un tempo molto variabile, da pochi giorni addirittura ad anni.

Studiosi recenti confermano il loro singolare modo di comportarsi; ne citerò alcuni.

Per esempio, il Camus, pur avendole trovate persistere negli animali vaccinati fino ad 8 mesi e mezzo dalla praticata vaccinazione, non può a meno di far notare come vi siano animali che perdono la refrattarietà pur essendo ancora il loro siero virulicida, e così è che si domanda anche se la sostanza virulicida sia l'agente principale immunizzante del sangue o un semplice indice dell'immunità dei tessuti (loc. cit., C. R. Soc. Biol., 1912, p. 122).

Così Süpfle fino dal 1908 negli animali vaccinati trovò che esse non appaiono in tutti e che la forza virulicida del siero è sottoposta a grandi oscillazioni; egli ha anche trovati animali che non ne possedevano.

Prowazeck e Jamamoto (1) col siero di conigli albini trattati con vaccino per via cutanea, endovenosa, intraperitoneale e intrapolmonare, fecero esperimenti in rapporto alle loro proprietà virulicide con risultati, essi dicono, incerti, variabili, spesso negativi. Col siero di conigli trattati più volte e per via endovenosa, con grandi quantità di linfa, non ottennero che una attenuazione del virus vaccinico.

E potrei ancora continuare nelle citazioni, se da sè stesse,

---

non è capace di passare i filtri di porcellana o Berkefeld, mentre noi sappiamo che si può sempre ottenere attraverso queste candele l'antigeno dal filtrato vaccinico e vaioloso contenente il virus, purchè lo mettiamo in condizioni di concentrazione adatta.

Inoltre gli anticorpi provocati da questa sostanza compaiono molto tardi e persistono lunghissimo tempo al contrario di quelli specifici del virus i quali, si dimostra con la prova del Bordet e Gengou, compaiono presto e ugualmente presto scompaiono.

(1) Prowazeck u. Jamamoto. *Experimentelle u. morphol. Studien ü. d. Vakzinevirus.* Münch. med. Woch., 1909, n. 51, p. 2627.

queste che ho elencate, pertinenti ad alcuni di quegli studiosi che in questi ultimi tempi si sono con maggior dettaglio e precisione occupati della questione dell'immunità antivaccinica, non fossero già sufficienti a mettere in guardia sull'importanza, che ciononostante, si vuole attribuire alle sostanze virulicide come gli unici fattori dell'immunità antivaccinica e antivaiolosa provocata dai sieri.

Ma io sono in grado di poter riferire un esperimento dal quale emanano dei fatti che a me son parsi molto interessanti a proposito dell'intervento di altri fattori immunizzanti, esistenti nei sieri, all'infuori delle sostanze virulicide.

L'esperimento riguarda un cane giovanissimo del peso di 6700 grammi, il quale venne inoculato con vaccino attivissimo per via cutanea l'8 gennaio 1908 e che fu oggetto di esperimento fino al marzo dell'anno successivo.

Riporto il diario dei primi esperimenti:

8 gennaio 1908: scarificazione sulla cute rasa dell'addome ed innesto sulla cute di vaccino attivissimo in 18 punti.

16 gennaio 1908: la pustolosi è fiorentissima in tutti i punti scarificati.

20 gennaio 1908: tutti i punti sono coperti di croste. Prova del Bordet e Gengou positiva. Potere virulicida del siero discreto (+ +).

24 gennaio 1908: le croste sono quasi tutte cadute. Prova del Bordet e Gengou positiva. Potere virulicida del siero discreto (+ +).

1º febbraio 1908: l'animale è da vari giorni completamente guarito della lesione cutanea. Prova del Bordet e Gengou positiva. Potere virulicida forte (+ + +).

Da quest'epoca riassumo in un quadro i risultati delle prove del Bordet e Gengou e del potere virulicida:

Data degli esami		Prova di Bordet e Gengou (1)	Prova del potere virulicida (2)	*Osservazioni*
12 febbraio	1908	+ + +	+ + +	Dunque il 20 gennaio è positiva la prova del Bordet e Gengou e il 28 febbraio diventa negativa. *Le sensibilizzatrici sarebbero quindi state dimostrabili in circolo per circa 40 giorni.* Il tempo preciso non posso fissarlo perchè nell'intervallo dal 21 al 28 febbraio non ho fatto ricerche. Il 20 gennaio era dimostrabile nel siero un discreto potere virulicida che si mantenne fino al 24 e poi si trovò forte il 1° febbraio e tale si mantenne fino al 12 dicembre. Fu trovato debole il 27 gennaio 1909 e assente nel mese seguente. *La virulicidìa del siero sarebbe quindi durata circa un anno.*
21 id.	»	+ + +	+ + +	
28 id.	»	—	+ + +	
12 marzo	»	—	+ + +	
28 id.	»	—	+ + +	
7 aprile	»	—	+ + +	
19 id.	»	—	+ + +	
30 id.	»	—	+ + +	
25 maggio	»	—	+ + +	
27 giugno	»	—	+ + +	
3 luglio	»	—	+ + +	
5 settembre	»	—	+ + +	
12 dicembre	»	—	+ + +	
27 gennaio	1909	—	+ +	
15 febbraio	»	—	—	
28 id.	»	—	—	
12 marzo	»	—	—	

(1) Indico + + + la positività della prova — la negatività.

(2) Indico un potere virulicida forte con + + +, un massimo di 50-80 pustole, determinate da un cmc. di vaccino trattato con un siero virulicida (1:1), vaccino che normalmente anche nelle diluizioni 1:250 (con siero fisiologico) determina una pustolosi confluente; con + + un potere virulicida discreto (circa 150-200 pustole ottenute nelle stesse condizioni di cui sopra); con — un potere virulicida non dimostrabile cioè l'esito in pustolosi confluente.

Il 15 febbraio 1909 intanto il cane venne salassato e tolta la parte del siero che servì per le prove di cui nella tabella precedente, ne rimasero 39 cmc. che vennero divisi in tre parti: una di 20 cmc., la seconda di 15 e la terza di 4, praticando la ripartizione a mezzo di apposito apparecchio già da me descritto per poter ottenere la divisione dei filtrati in modo da avere garanzia assoluta della loro sterilità (l. c. *Ann. Igiene*, 1907, p. 560).

Nella provetta contenente i 4 cmc. di siero venne innestato 1 cmc. di leucociti sterili sospesi in miscela citrosodica sterile e

posta a + 10^{o}-12^{o} (1) per vedere se nei leucociti comparissero i granuli mobili volpiniani. L'osservazione eseguita il 23, cioè dopo 8 giorni, risultò completamente negativa. Il centrifugato rappresentato dai leucociti, inoculato, dopo triturazione accurata, sulla cornea dei conigli, rimase del pari senza azione, sia macroscopica che microscopica. Ciò mi persuase che il virus non esisteva nel siero.

Il 28 febbraio intanto inoculava nelle vene ad un coniglio albino del peso di gr. 1120 gli altri 20 cmc. dello stesso siero e in un terzo, del peso di gr. 1090, nel sottocutaneo, i rimanenti 15 cmc.

Trascorse 4 ore in ambedue praticava la vaccinazione cutanea, su 40 cmq. di superficie, con vaccino attivo diluito 1/250. Ecco i risultati coi relativi due controlli:

Coniglio peso gr. 1170 inoculato con solo vaccino: *pustole confluenti.*

Coniglio albino peso gr. 1120 già inoculato nelle vene col siero: *pustole* 45.

Coniglio albino peso gr. 1090 già inoculato nel sottocutaneo col siero: *pustole* 31.

Controllo contemporaneo del 1° coniglio inoculato col solo vaccino: *pustole confluenti.*

Controllo contemporaneo del 2° coniglio inoculato col solo vaccino: *pustole confluenti.*

Il siero di questo cane, dunque, inoculato nella quantità di 15-20 cmc. rispettivamente sotto cute e nelle vene a conigli, *si mostrò indubbiamente dotato di potere immunizzante pure essendo sfornito di proprietà virulicide dimostrabili.*

L'opinione degli studiosi che l'azione immunizzante dei sieri antivaccinici e antivaiolosi risieda nella presenza in essi di sostanze virulicide non ha dunque importanza?

Ho giá fatte presenti certe constatazioni di alcuni studiosi che lasciavano adito a qualche sospetto al riguardo.

Ora è il caso di ricordare altri fatti.

Così Béclère, Chambon e Ménard avevano notato che la refrattarietà alla vaccinazione cutanea si è già determinata quando il potere antivirulento del siero non è ancora giunto al suo culmine.

---

(1) Per le colture del virus nei leucociti, dopo prove fatte a varie temperature ho prescelto questa. È del resto noto che i leucociti si autolizzano meno facilmente attorno agli 11° C. Quando però volevo ottenere l'antigeno, allora ponevo senz'altro i tubi a 37° C. come è già stato detto nel capitolo precedente.

Così gli stessi AA. avevano affermato che l'immunità dei vaccinati o vaiolosi passa per due fasi di durata variabile, «l'une où la conservation de l'immunité coïncide avec la persistance du pouvoir antivirulent du sérum, d'ailleurs plus ou moin amoindri, l'autre où ce pouvoir semble avoir complètement disparu tandis que l'immunité demeure encore suffisante pour mettre obstacle à toute nouvelle inoculation sous-épidermique» (l. c. *Ann. Pasteur*, XIII, pagina 120).

Ciò che dimostra che questi vecchi sperimentatori avevano già constatato anche quest'altro fatto senza sapersene dare la ragione.

B) *Presenza nelle lesioni vacciniche di una sostanza dotata di potere immunizzante locale.*

L'esperimento citato e le osservazioni che ho riportate sui rapporti di tempo tra comparsa di sostanze virulicide nel sangue ed immunità dei tessuti, mi spinsero a nuove indagini, prendendo punto di partenza, non dal sangue, ma dai tessuti invasi dal virus. E però ritornai ad alcune ricerche che avevo fatto eseguire nel mio Istituto su gli autolizzati di cute e di rene di coniglio inoculato con vaccino, dai quali autolizzati, come ora dirò, si era potuta ricavare una sostanza immunizzante ad azione locale (1-2).

Nella letteratura io non ho trovato che poche ricerche che possono assomigliarsi. Cito Arndt (3) il quale avrebbe fatto un estratto di pelle di coniglio vaccinato e immunizzato, estratto che inoculato sulla pelle, dopo 10 giorni avrebbe reso il coniglio immune verso l'inoculazione cutanea. Noto ancora che Prowazeck (4) avrebbe osservato che non si immunizza una cornea trattata con succo di cornea immune e che dello stesso A. sarebbero alcune esperienze sulla neutralizzazione di una cornea infetta mediante una quantità proporzionata di materiale cellulare, tolto da cornee immunizzate (l. c. Münch. med. Woch., n. 19, maggio 1906, p. 752).

Benchè eseguite con materiale diverso, tuttavia accanto alle citate ricerche colloco quelle del Ponndorf (5), il quale avrebbe tro-

---

(1) Tocco. *Immunizzazione con la cute infetta di vaiolo bovino autolizzato.* Gazz. Ospedali, Milano, n. 139, 1912

(2) Gennari Deplano. *Tentativi di vaccinazione con i prodotti autolitici di organi infetti da vaiolo bovino.* Pathologica, Genova, 1912, vol. IV.

(3) Arndt. *Studien ü. Immunität und Morphologie bei vaccine.* C. f. Bakt., I. A. O., Bd. XLVII, 1908.

(4) Prowazeck. *Unter. ü. d. Vaccine,* III Mem. Arb. a. d. Kais. Gesumdheit, 1907.

(5) Ponndorf. *Expériences d'emploi avec la toxique vaccinal.* Revue int. de la vaccine, Tours, T. IV, pag. 103, 1913.

Experiences d'emploi d'antitoxique vaccinal chez le lapin. Id., ib., pagina 108.

vato nel siero degli animali immunizzati una sostanza antagonista alla linfa disseccata sottoposta ad un lungo trattatamento nel mortaio a palle, nella quale linfa egli dice che in seguito a questo trattamento non si poteva contenere il virus. Si tratterebbe, secondo l'A., di un antitossico esistente nel siero dacchè egli chiama *tossico vaccinico* la linfa così trattata. E se io non erro, è con questo tossico che il Ponndorf sarebbe riuscito con un trattamento immunizzante, durato anni, ad ottenere dei sieri che (inoculati in quantità di cmc. 10-13.5 sottocute) avrebbero immunizzato la cute di conigli nuovi contro l'inoculazione di vaccino praticata 12–24 ore dopo.

Certo è discutibile che nella linfa così trattata il virus sia realmente morto, giacchè il virus nella linfa vaccinica secca diventa resistentissimo (1). Spesse volte anche quando con questo materiale secco e tritato non si producono fatti sulla cute, si può ancora ottenere la cheratite guarneriana microscopica o provocare la formazione del reperto granulare mobile visibile in campo oscuro (2) nelle cellule corneali. Io ho dei vaccini di cui ho studiato la virulenza che anche dopo 90 e 123 giorni di essicamento si sono comportati in questo modo, cioè o hanno prodotto la cheratite guarneriana o il reperto granulare mobile o l'uno e l'altro, mentre innestati sulla cute si mostravano del tutto privi di azione locale.

Inoltre ho più volte dimostrato che sottoponendo il vaccino a trituramento accuratissimo si è ben lungi dall'inattivarlo: in questo errore cadde il Santori (3) prima che io dimostrassi la filtrabilità del virus, ciò che riesce bene sottoponendolo al trituramento in presenza di quarzo in tre successivi mortai di porcellana, di agata, di acciaio (4). Con questo mezzo anzi il virus si libera dagli elementi cellulari in cui è indovato, prova ne sia che i vaccini così trattati sono più virulenti dei vaccini lasciati tal quale o mediocremente pestati.

Tuttavia, a parte queste considerazioni e questi dati sull'esistenza probabile del virus vivente, nel così detto tossico del Ponndorf, non si può negare che la immunità ottenuta dallo stesso Ponndorf nei conigli sia stata una immunità, sebbene parziale,

---

(1) Tutti gli studiosi che si sono occupati della conservazione della linfa sono d'accordo in questo. Citerò alcuni dei più recenti: il CARINI (Centr. f. Bakt., I. Abt., Bd. XLI, 1906) che la trova ancora attiva per 35 giorni a 37°. ACHALME e PHYSALIX (Bull. Soc. Path. exotique, T. II, 1909) che la trovano attiva per 1 anno. TOMARKIN e SEREBRENIKOFF (Arch. f. Sch. u. Trop.-Hygiene, Bd. XIV, luglio 1910) che la trovano attiva per 3 anni sempre a 37°, ecc.

(2) Non credo sia qui il luogo di riferire la letteratura riguardante questi granuli. Essa si trova esposta in modo completo nel mio lavoro: *I virus filtrabili vaccinico e vaioloso nella loro forma granulare.* Ann. Igiene sper., Roma, 1912, pag. 707–811.

(3) SANTORI F. *Filtrazione, diluizione e triturazione del vaccino.* Ann. Igiene sper., Roma, 1904, pag. 583.

(4) La tecnica per ottenere filtrabili i virus vaccinico e vaioloso da me adottata, trovasi esposta in vari miei lavori tra cui in quello *Sulla etiologia del vaiolo umano.* Ann. Igiene sper., 1910, pag. 6.

immediata al trattamento (egli l'ottenne entro 12-24 ore dall'avvenuta inoculazione del siero) per cui non si può a rigore parlare in essa dell'intervento del virus.

I miei primi autolizzati vennero preparati dalla cute e dal rene, dopo triturazione in mortaio di porcellana in presenza di quarzo e poi in mortaio d'acciaio, mosso meccanicamente (1) e usati dopo essere stati non meno di 20 giorni a 42° C. quelli della cute, e vari giorni a 37° C. quelli del rene. Inoltre, poichè si constatò che i filtrati attraverso le candele Berkefeld W, anche concentrati, non avevano alcuna azione immunizzante, il materiale che fu usato negli esperimenti fu il residuo rimasto sul filtro, il quale residuo veniva ripreso in glicerina per l'uso.

Di tutti gli autolizzati di cute raccolta in varie epoche, cioè nel periodo prepustoloso, in piena efflorescenza pustolosa a guarigione della lesione ed a immunità acquisita, *quello che diede migliori risultati fu l'autolizzato della cute raccolta in piena efflorescenza vaccinica.* Esso inoculato sulla pelle dei conigli se non determinò una immunità in tutto l'àmbito cutaneo, certo determinò una immunità parziale.

Di tutti gli autolizzati di rene, raccolti poco dopo l'inoculazione (15 giorni) durante il periodo in cui presumibilmente il virus si trova nell'organo o dopo molto tempo dell'inoculazione (42-50 giorni), quello che diede migliori risultati fu l'autolizzato di rene estirpato precisamente nel periodo in cui era presumibile vi si trovasse il virus.

Ma poichè tanto negli esperimenti eseguiti coll'autolizzato di cute, quanto in quelli eseguiti coll'autolizzato di rene, il virus non poteva ritenersi vivente (2) e, d'altro canto, esperimenti eseguiti con reni contenenti il virus, ove questo non poteva presumersi vi si fosse già localizzato, non permettevano di ottenere un autolizzato immunizzante, non al solo virus potevano attribuirsi proprietà preventive.

Sulla base di questi fatti avendo avuto occasione di dimostrare che il virus vaccinico si può coltivare con tutta probabilità nei

(1) Per la tecnica dettagliata rimando ai lavori del Tocco e del Gennari (l. c.).

(2) Questa osservazione si ricava da una serie di ricerche personali sull'azione degli autolizzati sulla cornea, nella quale mai con detti autolizzati potei provocare il fenomeno guarneriano microscopico e dalle mie indagini a mezzo delle colture nei leucociti che risultarono tutte negative.

leucociti sterili (1) ho voluto vedere se coll'autolizzato di leucociti in cui esistesse il virus si potessero ottenere uguali risultati (2).

A tal uopo procuratomi leucociti sterili dal cavo peritoneale di conigli inoculati con aleuronato sterile, preparato secondo la tecnica adatta ad estrarre la legumina (Vedi Rempicci, *Giorn. R. Soc. Ig.* Milano, 1901) e aggiunti questi a vaccino filtrato attraverso le candele Berkefeld W, centrifugato il materiale dopo 8-10 giorni, ho triturato accuratamente il deposito e l'ho lasciato autolizzare in acqua salata a 40° per 8 giorni e quindi ho ripetuto gli stessi esperimenti di inoculazione cutanea già riferita nei lavori su citati.

Di 6 conigli su cui sperimentai ne sopravvissero 2, sulla cute dei quali, dopo 12 giorni dal trattamento, fu innestato del vaccino diluito il quale in due controlli dava luogo rispettivamente a 125-

---

(1) Che il virus possa trovarsi nei leucociti è indubbio. Cito qui alcuni dati che avrei anche potuto riferire prima. Così, il Prowazeck lo ha dimostrato insieme a Jamamoto con un esperimento interessantissimo. Egli ha emesso l'ipotesi che il virus scompaia dall'essudato peritoneale per azione fagocitaria senza essere però completamente annientato; infatti nell'essudato peritoneale ricavato dopo 4 ore da un coniglio (nel cui peritoneo era stato inoculato del brodo di aleuronato e poi dopo 23 ore, della linfa vaccinica triturata con quarzo) filtrato alla carta e centrifugato, egli ottenne un deposito che inoculato nella cornea dei conigli rispose positivamente, mentre già dopo 2 ore dall'inoculazione, l'essudato s'era dimostrato non più virulento. Per cui l'A. ne concluse che il virus era soltanto racchiuso nei leucociti senza alcun danno.

Ma non basta, praticando lo stesso esperimento sui conigli in precedenza immunizzati per via endovenosa ed endoperitoneale, gli AA. acquistarono l'impressione che l'azione fagocitaria di fronte al virus vaccinico nei conigli immunizzati fosse aumentata.

Io stesso ho fatto delle ricerche nei polli inoculati con vaccino nelle vene, sottocute e sulla cute, ed ho trovato che i leucociti conservavano il virus nel sangue circolante per vario tempo, anche settimane. (*La variole bovine chez les poulets.* Revue int. de la vaccine, T. I, 1910, p. 19).

(2) Oltre le mie riferite nel Cap. I, sono state fatte ricerche per vedere se sostanze immunizzanti esistano nei leucociti di animali immunizzati. Henseval e Convent infatti dicono in una nota che hanno cercato di scoprire la sostanza antivirulenta nei leucociti grossi mononucleari e polinucleari col metodo di A. Kling, nel midollo delle ossa lunghe del coniglio, 18 giorni dopo la vaccinazione. *Ma non ne hanno potuto constatare alcuna traccia.* Anche Camus sperimentando col sangue *in toto* fa presente che i fagociti di un animale immunizzato non provocano maggiore immunità della iniezione di siero (Soc. Biol., p. 197, 1912). Prowazek tuttavia ai leucociti disgregati nella milza, nel rene e nella cornea pare dia una notevole importanza nei fenomeni immunitari, con esperimenti molto interessanti (V. Munch. med. Woch., 1905, n. 19).

160 pustole su 25 cmq. di superfice. I risultati furono assai confortanti inquantochè, sulla cute dei conigli in esperimento, si ottennero in uno solo 9 pustole e nell'altro soltanto 3 (1).

L'autolizzato dei leucociti era sterile del virus: per lo meno inoculato sulla cornea dei conigli non diede luogo alla cheratite guarneriana microscopica, nè si osservò entro le cellule epiteliali corneali alcun reperto microscopico di granuli mobili visibili in campo oscuro, come nella cheratite vaccinica.

Ciò mi portava a concludere che nell'autolizzato di leucociti contenenti il virus vaccinico, al pari che in quelli di cute e di rene, si trovava una sostanza dotata di potere immunizzante.

C) *Presenza nel siero di una sostanza neutralizzante quella che si ricava dalle lesioni vacciniche.*

Stando così le cose ho voluto vedere come i sieri immunizzanti degli animali, non contenenti nè anticorpi nè sostanze virulicide, si comportassero, messi in contatto con le sostanze immunizzanti estraibili coll'autolizzato della cute, del rene, dei leucociti.

Aggiunsi perciò 1 cmc. di autolizzato di leucociti (stati per 8 giorni a 37° C., in filtrato di vaccino attraverso Berkefeld W) ad 1 cmc. di siero di animale immunizzato e lasciai il miscuglio a + 4° per 12 ore: poi inoculai il materiale sulla cute di una serie di conigli, precedentemente rasa e raschiata con carta vetrata. Attesi 12-24 ore, 3-4-8-10 giorni e poi inoculai sulla stessa cute del virus vaccinico diluito 1/500 il quale nei due controlli dava una pusto losi confluente. Il risultato fu chiarissimo: in tutti e sei i conigli non solo ottenni una pustolosi confluente come nei controlli, ma più rigogliosa. E che l'esperimento fosse esatto è dimostrato da altre ricerche fatte trattando animali con l'autolizzato di cute, delle quali ricerche mi occupo nella parte III.

---

(1) Pensare che questi conigli si presentassero in condizioni di immunità naturale mi pare fuor di luogo: del resto non ho mai trovati conigli immuni. Voler riferire i risultati ad una immunità acquisita per la via respiratoria o gastrica, come quella che i vaccinatori affermano verificarsi nelle vitelle che soggiornano lungo tempo nelle stalle dei vaccinogeni, mi pare un assurdo: si tenga presente che la congerie degli esperimenti che riporto in questo lavoro si è svolta in un periodo lungo di anni, a cominciare dal 1908, e che non ho mai tenuto nelle stalle dell'Istituto degli allevamenti di animali, i conigli venendo acquistati ove a lotti, ove a piccoli gruppi e costantemente tenuti separati quelli inoculati con vaccino da quelli inoculati con sieri.

Stando ai risultati ottenuti si dovrebbe quindi ammettere che nel siero degli animali immunizzati il potere immunizzante risieda nella presenza di sostanze antagoniste a quelle che si producono entro gli elementi cellulari sotto l'azione del virus vaccinico.

D) *Origine e natura della sostanza immunizzante del siero.*

Su queste sostanze ho quindi fermata la mia attenzione per poter farmi un concetto sulla natura dei relativi anticorpi esistenti nei sieri.

Faccio notare che il Tocco, nel mio Istituto, per poter spiegare l'azione immunizzante locale cutanea degli estratti autolitici di cute infetta, si appellò ad alcune concezioni dell'Ehrlich in rapporto a quei fatti di *indisponibilità delle sostanze nutritive* che si collegano ai fenomeni di atrepsia cellulare (1).

L'A. emette l'ipotesi che la sostanza immunizzante dell'autolizzato possieda affinità grande per i ricettori di quelle sostanze nutritive delle cellule, le quali hanno anche affinità col virus, per cui essa inoculata sulla cute dei conigli, fissando queste sostanze nutritive, sia pure parzialmente, conduce le cellule a presentare indisponibilità di sostanze nutritive per il virus.

« E questa ipotesi », egli dice, « a me pare per ora la più accettabile anche perchè essa spiegherebbe la ragione per cui le nuove generazioni delle cellule che si formano nella cute riparata, cellule che non hanno subìta direttamente l'azione di detta sostanza immunizzante, non si presentino adatte, all'attecchimento del virus, ossia si riproducano dotate, dal nascere, d'immunità antivaccinica.

Basta perciò ammettere che sotto l'azione di questa sostanza non soltanto non si avveri una combinazione di essa con parte delle sostanze nutritive delle cellule, ma che avvenga in seguito a questa combinazione una perdita, o per meglio dire, come è nel caso nostro, una forte diminuzione dei ricettori delle sostanze nutritive e precisamente di quelli coi quali ha affinità anche il virus, ciò che è possibile, essendo noto, precisamente per opera dello stesso Ehrlich, che la perdita o la diminuzione di certi ricettori nelle cellule si può trasmettere per molte generazioni.

Qualunque altra spiegazione si voglia dare del meccanismo dell'azione immunizzante di questa sostanza, a me pare che per il momento non possa rispondere.

Riferire l'azione immunizzante ai prodotti del semplice autolizzato del pus vaccinico non è ammissibile, perchè è stato dimostrato in questo Istituto, gli autolizzati di pus non avere azione preventiva.

Riferire l'azione immunizzante ad una combinazione del virus o dei suoi ricettori con le sostanze immunizzanti, che si trovano nell'autolizzato, agenti da anticorpo, non ci spiegherebbe che l'immunità immediata all'innesto del virus sulle cuti contenenti ancora

(1) Ehrlich. *Ueber Athreptische Funktionen. Beiträge z. exper. Path. u. Chemotherapie.* Leipzig, 1909, p. 50.

le sostanze immunizzanti, non quella insita negli elementi cellulari di nuova formazione che sono precisamente quelli sui quali, nelle mie prove, si è fatto agire il virus.

Resta quindi in campo l'ipotesi da me emessa in base ai fatti addotti dall'Ehrlich sulla indisponibilità delle sostanze nutritive delle cellule, ipotesi la quale introduce nell'immunità vaccinica cutanea un fattore nuovo, quello dell'azione di una sostanza che si produce nelle cellule stesse durante l'infezione, avente affinità cogli elementi nutritivi del virus maggiore di quello che l'abbia lo stesso virus e quindi capace di provocare uno stato immunitario rendendo, entro le cellule, indisponibili precisamente le sostanze nutritive del virus ».

Sulla base delle idee accettate dal Tocco si potrebbe anche concepire l'azione immunizzante dei sieri neanche più virulicidi, contenenti una sostanza che è antagonista (ciò che parrebbe un assurdo), almeno a giudicare dai suoi effetti nelle mescolanze, alla azione immunizzante dell'estratto autolitico di cellule infette.

È chiaro che la sostanza immunizzante dei sieri non potrebbe essere rappresentata che dai medesimi ricettori nutritizi delle cellule sensibili al virus e alle sostanze immunizzanti dell'autolizzato resesi libere in circolo, poichè sono questi i ricettori che vengono ad essere stimolati nella loro moltiplicazione entro gli elementi cellulari. In tal modo si comprenderebbe come mettendo in contatto l'estratto autolitico delle cellule infette con questi sieri i ricettori esistenti liberi nei sieri, aventi con la detta sostanza affinità, vi si fissassero e potessero impedire l'azione immunitaria locale per non poter più fissarsi ai ricettori degli elementi cellulari e quindi stimolarne la moltiplicazione.

Resterebbe però difficile spiegare come mai i sieri degli animali immunizzati possano mantenere una carica di detti ricettori nutritizi in modo da contare lungamente sulla loro azione per ottenere fenomeni immunitari passivi anche quando sono scomparse le proprietà virulicide dei sieri. Bisognerebbe ammettere che la perdita dei ricettori non fosse totale, ma semplicemente parziale, e che nel riformarsene dei nuovi, una certa parte di questi potesse ancora liberarsi dagli elementi cellulari primitivamente stimolati e mantenersi in circolo.

A parte questa spiegazione, ingegnosa e sotto un certo riguardo soddisfacente, io ho considerato diverse altre condizioni di fatto che espongo.

Partendo dal concetto che nelle cellule infette in ultima analisi si osservano gli effetti di un'azione necrotica, la quale si manifesta con alterazioni tanto protoplasmatiche che nucleari (1) e che tale azione

---

(1) Ritengo superfluo riportare qui quanto è stato scritto al proposito, a cominciare dal WEIGERT (*Anat. Beitr. z. Lehre.* Pocken, Breslau, 1874), che l'ha chiamata necrosi jalina, all'UNNA (Münch. med. Woch., 1897) che l'ha chiamata necrosi reticolare, al LELOIR che l'ha chiamata necrosi cavitaria, a quelli che l'hanno chiamata necrosi da coagulazione, come può

si esplica per dato e fatto della moltiplicazione del virus entro gli stessi elementi cellulari, ho cercato di vedere se fosse possibile estrarre una sostanza dotata di tale azione necrobiotica, dalle cellule infette.

E poichè, intanto, negli autolizzati di cute infetta non poteva negare la presenza del virus sebbene, come sappiamo, morto e fors'anche distrutto, ho considerato la possibilità dell'esistenza di una tossina e di una antitossina (1).

Riguardo alla tossina vaccinica e vaiolosa esistono delle affermazioni che cominciano coll'Huguenin (2), al quale si deve, se in base alla sua affermazione ne derivò che l'immunità antivaiolosa

---

leggersi in altri lavori e in tutti i trattati. Non posso però a meno, per fissare bene i due punti su citati, di ricordare come le lesioni, giusto quanto osservò il GUARNERI (*Ricerche sulla patogenesi ed etiologia dell'infezione vaccinica e vaiolosa.* Arch. per le sc. med., Torino, 1892, vol. XVI), si inizino nel protoplasma il quale si rigonfia a assume uno speciale aspetto opaco (noto che anche nei focolai degli organi interni, nel vaiolo, è questo il fatto che prima colpisce, come hanno constatato molti studiosi tra cui KEYSSELITZ e MAYER (*Ueber Zellveränderungen in organen b. Variola.* Arch. f. Schff. u. Tropenhygiene, 1909), mentre il nucleo che generalmente viene spinto da un lato assume le forme più svariate, presentando prima fatti di picnosi, cromatolisi e poi di cariolisi (secondo PASCHEN la lesione nucleare è così evidente da ritenere il virus un veleno nucleare specifico) dimostrabili con adatte colorazioni. In breve si osservano poi chiari processi di autolisi, i quali, come abbiamo asserito VOLPINO (*I corpi mobili del vaccino e del vaiolo.* Pathologica, Genova, vol. I, 1909, p. 511) ed io (*I virus filtrabili vaccinico e vaioloso.* Ann. Igiene sper., 1912, p. 771), terminano nelle cellule corneali col distacco di frammenti bolliformi dalle cellule, molte delle quali si fondono nei loro contorni formando delle masse opache a struttura indefinibile, stadio questo che forse corrisponde a quello detto « Ballonierende degeneration » dell'Unna.

(1) Sull'azione biochimica del virus vaccinico e vaioloso sono state eseguite ben poche ricerche. Se infatti si tolgono quelle del CAMUS (*Recherches sur les ferments solubles du vaccin jennrien.* C. R. Soc. Biol., vol. I, pag. 1000, 1907) su di enzimi particolari, riuscite tutte negative salvo forse per quelli coagulanti, non saprei quali altri citare. Abbiamo però delle concezioni teoriche molteplici, che vanno dall'ammissione di una ipotetica tossina a quelle di una endotossina, a quelle di un'azione stimolante sulle blastine e quindi alla produzione di fenomeni di autocatalasi, quei fenomeni che condurrebbero alla teoria chimica dei virus filtrabili propugnata da Centanni e Hunger. (CENTANNI. *Sulle blastine.* Pathologica, Genova, vol. III, ottobre 1911).

(2) HUGUENIN. *Pocken. In Lubarsch-Ostertag Erg. d. Allg Path.* Wiesbaden, 1899.

sia per molti, una immunità antitossica. Egli, dice bene il Süpfle, partiva dalla premessa che l'infezione del sangue fosse il fatto principale, e la pustola l'accessorio tanto più che si trovava sotto l'impressione della teoria di Pfeiffer che i germi del vaiolo non invadessero territori istologici immuni.

Perchè una tale immunità fosse accettabile occorrerebbe, però fosse stato dimostrato che i virus vaccinico e vaioloso producano una tossina vaccinica e vaiolosa.

Ora nessun esperimento evvi, il quale dimostri da parte loro una produzione di tossine: quelli che potrebbero esservi portati a sostegno non essendo assolutamente accettabili.

Possono, per esempio, citarsi al riguardo le ricerche che sono state fatte sull'azione del materiale che dializza attraverso le membrane collodioniche, dalle quali viene trattenuta la polpa vaccinica.

De Waele e Sugg (1), è noto, mantennero dei sacchetti di collodion, contenenti del vaccino diluito in brodo, nel sottocutaneo di bovini per 3 e 7 giorni e rispettivamente all'8° e al 10° praticarono delle inoculazioni di controllo sulla cute, con risultati del tutto negativi. Evidentemente se una tossina fosse dializzata, la immunità vaccinica si sarebbe dovuta determinare, essendo noto che con l'inoculazione sottocutanea di vaccino nelle vitelle si può ottenere, entro questo limite di tempo, l'immunità cutanea.

Tale è la deduzione che va derivata dagli esperimenti di questi studiosi, in considerazione anche del particolare che essi, in seguito all'introduzione di questi sacchetti, ottenevano anche degli edemi sottocutanei con piccole quantità di liquido siero-purulento, ossia dei fatti locali che stavano a dimostrare il passaggio attraverso le membrane collodioniche di un materiale dotato d'azione irritante locale (2).

Teissier, Duvoir e Gastinel (3) invece, dopo avere introdotto sacchetti di collodion contenenti virus vaccinico, nel cavo perito-

---

(1) De Waele u. Sugg. *Exper. Unt. ü. Kuhpockenlymphe.* Centr. f. Bakt., Bd. XXXIX e *Sur la production de l'immunité par la méthode de sacs de collodion.* C. R. Soc. Biol., Paris, 24 dicembre 1904, t. II, p. 635.

(2) È evidente che nell'interno dei sacchetti di collodion, data l'aggiunta del brodo, si ottenevano delle vere colture batteriche, dovute alla moltiplicazione dei germi costantemente esistenti nella polpa vaccinica: i fatti locali sono quindi, a mio avviso, da ascriversi ai loro prodotti dializzati, se i sacchetti tenevano bene.

(3) Teissier, Duvoir et Gastinel. *Vaccinations expérimentales non tegumentaires chez le lapin* (I et II mémoire). Journal de Phys. e Path. gén., t. XIV, pag. 1009 e 1025.

neale, ottennero, purchè la quantità di virus fosse molto grande, l'immunità nei conigli verso il 10° giorno, immunità che veniva a mancare verso il 15° o il 20°.

Ma anche questi esperimenti non possono parlare in favore di un'immunità prodotta da sostanze tossiche.

Io, che ho fatto delle ricerche nel 1908 (1), per vedere se il virus vaccinico dializzasse attraverso membrane di collodion, *ho potuto accertare che nel dializzato passa il virus giacchè questo dializzato produce nelle cellule corneali i citoryctes guarneriani e i granuli mobili.*

Del resto Gastinel, in collaborazione con Teissier e Duvoir, dimostrarono con questo mezzo la possibilità di provocare nei sieri la formazione di anticorpi e di destare proprietà virulicide, ossia due fatti che non possono che essere in relazione col passaggio del virus attraverso le membrane collodioniche.

Del resto ancora, Prowazeck, coi filtrati di linfa vaccinica (ottenuti attraverso filtri Berkefeld circondati da uno strato di collodion) *privi di germi e di virus*, non poterono immunizzare i conigli in nessun modo.

E Süpfle coll'acqua salata o col siero in cui aveva tenuti immersi dei sacchetti di cellulosa contenenti virus vaccinico, ottenne nel 50 % dei conigli una pustolosi tipica, inoculandoli 10-12 giorni dopo dall'innesto dell'acqua salata o del siero e nell'altra metà una efflorescenza più limitata o abortiva, ossia dei risultati che stanno sempre, a mio avviso, in relazione col passaggio del virus anche attraverso le membrane cellulosiche, quantunque l'A. venga alla conclusione che gli antigeni del vaccino dializzano, sebbene con difficoltà, attraverso le membrane cellulosiche.

Nè a far pensare alla possibilità dell'esistenza di una tossina vaiolosa, alla quale legare la formazione di una antitossina, possono citarsi le esperienze del Ponndorf col suo tossico vaccinico, perchè, come ho già accennato nel principio di questo lavoro, non si può escludere nel tossico del Ponndorf la presenza del virus per quanto attenuato. Ad ogni modo anche ammettendo trattarsi di un tossico, è certo che con esso non può ottenersi una antitossina in tale quantità di immunizzare realmente un animale. Basta infatti leggere i diari del Ponndorf per constatare che i suoi sieri anche in dose di 10 cmc. inoculati nel sottocutaneo degli animali a 24 ore

---

(1) *Sul passaggio del virus vaccinico attraverso le membrane collodioniche.* Soc. tra i cultori di sc. med. e nat. di Cagliari, 30 maggio 1908.

dall'inoculazione del virus sulla cute, non la immunizzavano totalmente: i punti scarificati presentavano infatti una forte infiammazione, che durava per 3 giorni, ed in un caso l'A. segnala anche la formazione di papule al 5° giorno, e al 6°, dice nel suo diario, « le pustole si disseccavano ».

Stando così le cose tutte le ricerche fatte, sottoposte ad accurata disamina *non avvalorano in alcun modo l'esistenza di una tossina vaccinica e vaiolosa e per conseguenza quella di una antitossina nei sieri immunizzanti.*

Le questioni della tossina vaiolosa e vaccinica e della corrispondente immunitaria antitossica mancano quindi evidentemente di ogni base scientifica.

Consideriamo ora la possibilità dell'esistenza di una endotossina, data sempre l'indiscutibile presenza del corpo del virus nell'autolizzato.

A tal uopo ho concentrato delle enormi quantità di filtrato vaccinico ottenuto attraverso le Berkefeld W, e autolizzatolo a 40°-41° l'ho inoculato sulla cornea dei conigli e sulla cute degli stessi.

Il risultato però è stato del tutto negativo giacchè, quando il virus non era dimostrabile più in alcun modo nel materiale d'innesto, nessun fatto apprezzabile, nè macroscopico, nè microscopico, si notava nel sito d' inoculazione.

Ecco qualche esperimento :

Provenienza del vaccino	Granuli mobili nei leucociti innestati nel filtrato tenuto a 12° per 7 giorni	Innesto diretto dell'autolizzato nelle cornee metodo Negri e tatuaggio corneale		Lesioni corneali	
		Granuli mobili in campo oscuro	Granuli bleu (colorazione mio procedimento)	microscopiche (citorictes)	macroscopiche
Filtrato di circa 22 gr. di vaccino concentrato a 1/10 (ridotto a cmc. 110) autolizzato per 14 giorni a 40°-41° e sbattuto 4 ore al giorno in apparecchio di Lautenschläger	—	—	—	—	panno che scompare presto.
Filtrato di 4 gr. di vaccino concentrato a 1/10 (ridotto a cmc. 110) autolizzato per 10 giorni come sopra	—	—	—	—	panno che scompare presto.
Filtrato di 4 gr. di vaccino concentrato a 1/10 (ridotto a cmc. 110) autolizzato per 8 giorni come sopra	+	+	+	+	tipica lesione vaccinica.

N. B. — Ho citato questi tre esperimenti in cui furono eseguite tutte le ricerche di cui nella tabella; ma ne posseggo altri in cui ho fatto la sola ricerca dei granuli mobili nei leucociti riuscita negativa; i filtrati corrispondenti non produssero alcun fatto nella cornea. In due altri furono trovati i granuli mobili nei leucociti e tardivamente anche nelle *cellule corneali*: in una di queste cornee, la sola che fu esaminata anche per questo scopo in 5ª giornata dall'innesto, furono trovati scarsi citorictes.

E non poteva essere diversamente: gli esperimenti eseguiti con virus ucciso col calore, quelli eseguiti con virus ucciso con bile, e sopratutto quelli eseguiti con vaccino inattivato da siero virulicida, avevano già in mano di diversi studiosi escluso che dal corpo del virus si potesse ricavare una endotossina.

Resta quindi incomprensibile come, la teoria di v. Pirquet, che ha avuto l'idea di lumeggiare il meccanismo dell'immunità antivaccinale con dati teorici, derivati da dati clinici, possa essere stata così unanimamente accettata pur essendo essa in gran parte basata sull'esistenza di una *endotossina* vaccinica.

Non è certo questo il posto perchè io la riassuma: dirò sol-

tanto che egli ammette il virus vaccinico sia costituito da due sostanze: il contenente o l'involucro e il contenuto o endotossina. Ad ognuna di queste due sostanze ascrive un potere antigenico: l'involucro sarebbe l'antigeno che determina la produzione delle lisine, il contenuto quello che provoca la formazione delle antitossine.

L'immunità sarebbe devoluta alle lisine ed alle antitossine, ma principalmente alle lisine, giacchè le antitossine scomparirebbero presto, le lisine invece permarrebbero per maggior tempo.

Non mi addentro sugli altri concetti della teoria pirquetiana e particolarmente sul meccanismo della vaccinazione per il quale l'A. invoca una particolare ipersensibilità dell'organismo contro la endotossina, in seguito alla quale, col ripetersi della vaccinazione e venire in contatto la tossina coi residui dell'antitossina, si formerebbe una combinazione di tossina-endotossina non saturata, che determinerebbe una reazione cutanea specificamente tossica, esplicantesi colla così detta reazione vaccinale precoce.

Farò riflettere, col Süpfle, che nella teoria del Pirquet è certamente molto strano il modo di produzione delle antitossine, poichè se nella prima vaccinazione la presunta tossina vaccinica eccita la formazione di antitossine, le quali poi scompaiono, non è concepibile che poi rivaccinando gli individui, non si formino nuove antitossine e più forti quantità delle stesse.

D'altro canto anche attenendosi alla teoria del Pirquet, non evvi ragione, come fa riflettere il Süpfle, di dover ammettere le antitossine quando, corrispondentemente al concetto di Wolff-Eisner (1), i corpi immunizzanti litici bastano per una spiegazione, poichè essi dissolvendo l'involucro del virus e rendendo libera la endotossina, non farebbero altro che permettere a quest'ultima di esercitare la sua azione locale.

Più frequentemente si vaccina, dice Süpfle, più vivacemente si stimola la produzione delle lisine e più concentratamente l'endotossina perviene alla sua azione locale, cioè, più di frequente si inficia la cute con il vaccino, tanto più essa si adatta a reagire allo stimolo con fenomeni flogistici.

Noto che Süpfle non si adatta alla concezione immunitaria del Pirquet anche in considerazione del fatto che le endotossine batteriche si ritenevano incapaci di produrre delle antiendotossine e certamente questa osservazione del Süpfle ha ancora il suo valore perchè è sempre molto difficile di poter ottenere dei sieri antien-

---

(1) Wolff-Eisner. *Entgegnung auf vorst. Bemerkung.* Berl. klin. Woch , 1908, p. 458 (citato anche da Süpfle).

dotossici, tanto è vero che Wolff spiegò in questo modo la impossibilità di poter preparare dei sieri battericidi per uso terapeutico. Però bisogna anche dire che Besredka (1) ha dimostrato che si possono ottenere dei sieri anche fortemente antiendotossici inoculando direttamente nelle vene, in grandi masse, le colture batteriche e quindi oggi non sarebbe più possibile presentare un tale argomento contro l'esistenza di una endotossina vaccinica.

Piuttosto, c' è da far presente al v. Pirquet che è la endotossina vaccinica che non si riesce a discoprire qualunque mezzo si usi per disgregare il virus batterico: il materiale che si ricava non è tossico; anche ricorrendo al metodo che il Besredka ritiene il più adatto ed il più semplice per rivelare la esistenza di endotossine, cioè uccidere il virus col calore il che darebbe l'endotossina bruta, non si riesce ugualmente allo scopo. Evidentemente il corpo del virus vaccinico, disgregato, non ha azione tossica (2).

Messe così da parte le ipotetiche tossine ed endotossine vaccinica e vaiolosa, non restava che pensare ad una sostanza prodottasi nelle cellule nell'alterato metabolismo sotto l'azione del virus in esse indovato, una sostanza, rappresentata quindi da un veleno secondario, capace di proprietà antigeniche.

---

(1) Gli studi di Besredka riguardano specialmente l'endotossina tifica (Ann. Inst. Pasteur, 1905-1906). Egli ha inoltre riassunto magistralmente lo stato della quistione nell'articolo *Endotoxines microbiennes.* (Bull. Inst. Pasteur, vol. XII, n. 5 e 6, 1914).

(2) Noto che il Gastinel al quale si devono, come già sappiamo, studi importanti oltre che sulle sostanze virulicide, nel siero degli individui vaccinati e dei vaiolosi, anche sugli anticorpi, ritorna in questi ultimi tempi alla teoria pirquetiana adattandola ai risultati dei suoi esperimenti.

Le nostre ricerche, egli dice, hanno condotto a delle constatazioni che quadrano singolarmente con la teoria del Pirquet. « Des deux types d'anticorps qu'il décrit, nous pouvons rapprocher les deux types de reactions humorales constamment retrouvés comme s'il existait entre eux un étroit rapport. Ne peut-on penser que l'antitoxine de Pirquet représenterait l'anticorps qui donne la réaction de fixation et qui disparaît ensuite, transitoire dans sa durée comme la réaction qui décèle? ».

Non è però possibile accettare queste idee del Gastinel, giacchè le sensibilizzatrici scompaiono non solo prestissimo ma completamente, mentre nella teoria pirquetana la scomparsa assoluta delle antitossine non è ammessa. Del resto non si potrebbe comprendere quale potesse esser il valore di un tale adattamento alla citata teoria di Pirquet, quando l'azione delle sensibilizzatrici unite al complemento si riduce poi a quella stessa delle lisine, quando cioè in ultima analisi esse non fanno che aumentare il potere antivirulento dei sieri immunizzanti. Nella teoria pirquetana non occorre già la dimostrazione di un'altra sostanza ad azione virulicida, ma quella di un'antitossina, ciò che è ben diverso.

Ciò ha richiamato alla mia mente gli studi sui così detti metantigeni e relativi metanticorpi su cui ha fermata l'attenzione il Centanni (1).

Fissiamo anzitutto i punti fondamentali della questione. Noi sappiamo, dagli studi di questo A., che nella trasformazione delle proteine naturali od ortoproteine, prima di giungere ai composti chimici terminali, le reazioni biologiche rivelano delle modificazioni particolari di queste proteine per le quali passano a *metaproteine* come le ha chiamate l'A. stesso.

Sappiamo ancora che funzionando queste come le prime da antigeni, possono dar luogo a degli anticorpi che nel caso in specie chiamansi *metanticorpi* e non ignoriamo che nella trasformazione delle ortoproteine in metaproteine, nel disordine cellulare si formano altri principî anormali cioè dei metantigeni secondari o autolitici per essere il processo di autolisi la massima sorgente, come dice il Centanni, di essi.

Orbene, nella infezione vaccinica noi possiamo ammettere che le modificazioni intervenute nella compagine cellulare diano luogo precisamente a metantigeni e che essi nell'individuo infetto funzionino in primo tempo da sostanze vaccinanti determinando la produzione dei relativi anticorpi capaci anche di passare in circolo, anticorpi che restano inocui per l'organismo poichè non adatti agli ortantigeni ossia alle proteine non modificate, ma solo ai metantigeni.

E che esistano dei metantigeni nei focolai infetti potrebbe, forse, già derivarsi in parte dalle prove di deviazione del complemento, perchè, come ho riferito nel capitolo precedente, una certa azione per quanto debole e trascurabile in detta prova, l'hanno altre sostanze oltre al virus esistente nell'antigeno.

Ma la prova dell'esistenza dei metantigeni si può avere ripetendo l'esperimento che il Centanni eseguì nella distomatosi bovina.

Ricordo che egli mescolando siero di bovini, affetti da distomatosi, con estratto di fegato fresco o autolizzato, trovò che si precipitava solo l'estratto di fegato autolizzato, qualunque fosse il fegato o malato o sano adoperato e dedusse da ciò, trovarsi in presenza di una reazione avente per base una deformazione autolitica generica.

Ora io ho ripetuto l'esperimento del Centanni eseguito con antigeno di cute normale o di cute malata più siero di conigli vaccinati ed ho trovato che il siero di conigli malati non agiva bene

---

(1) Centanni. *I metanticorpi nella patologia e nella terapia.* Pathologica, vol. I, 1909, pag. 257.

in presenza di un antigeno di fresco preparato, ma solo di fronte ad un antigeno autolizzato per un certo tempo (1).

Parmi quindi, in mancanza di dati strettamente chimici, ci si possa fondare su questi strettamente biologici per concludere che le sostanze immunizzanti che si trovano nei sieri, indipendenti dalle sensibilizzatrici e dalle sostanze virulicide, siano nient'altro che dei metanticorpi.

Così veniamo anche a spiegarci le reazioni immediate all'innesto del virus, nella rivaccinazione, giacchè quando in un individuo immunizzato ripetiamo l'innesto del virus verremmo a determinare nuova produzione di metantigeni e poichè non dobbiamo dimenticare che abbiamo ancora in circolo dei metanticorpi è chiaro che provochiamo, nella stessa compagine cellulare, il precipitarsi del metanticorpo sul metantigeno determinando così, per usare le parole del Centanni, nella cellula l'azione citotossica che gli è propria, i metanticorpi, dice l'A., costituendo il fattore, se non esclusivo, certo principale delle forme di ipersensibilità, di anafilassi, allergia (2).

PARTE II.

Immunità mediata al trattamento sieroterapico.

Cap. I.

Indagini sulla presenza del virus nei sieri che determinano una immunità tardiva o mediata.

A ben considerare il modo di comportarsi dei sieri antivaccinici, un fatto non può sfuggire, ed è quello della difficoltà di poter ottenere con essi una immunità cutanea completa, anche inoculando agli animali, in una o più volte, enormi dosi di siero.

---

(1) La prova è delicatissima: occorre eseguirla diverse volte, trovare la giusta diluizione dell'antigeno che permetta di percepire i fenomeni zonali. Non vi insisto sopra, però, perchè non l'ho ripetuta a sufficienza con lo scopo di precisare, entro i limiti voluti, la tecnica, in modo da dare dei dati fissi sulla diluizione dell'antigeno.

(2) La presenza dei metantigeni e dei relativi anticorpi potrebbe, come ha fatto Gastinel per le sensibilizzatrici, trascinare qualche studioso a un nuovo adattamento della teoria pirquetiana. Reputo inutile sottoporre una tale possibilità alla voluta critica. Farò semplicemente notare che i metanticorpi da me trovati in circolo non possono fare le veci della

Allo scopo di ricercare se si potesse cogliere un momento in cui, nei sieri, le proprietà immunizzanti fossero maggiori, ho eseguito un gruppo di ricerche coi sieri di 3 cani e di 6 conigli.

Gli animali vennero inoculati sulla cute con 1 gr. di vaccino attivo (coprendo poi la parte inoculata con una specie di impacco) e contemporaneamente sotto cute e nelle vene con vaccino filtrato attraverso Berkefeld W (ogni volta con tanto filtrato pari a gr. 0,5 di vaccino).

Il trattamento per queste due ultime vie si ripetè per 5 volte regolarmente di mese in mese e perciò alla fine del trattamento si giudicò aver inoculato nelle vene agli animali gr. 2,5 di vaccino. Un cane e due conigli morirono durante il trattamento, sicchè dopo un mese dall'ultima inoculazione, restarono due cani e quattro conigli.

Questi animali vennero completamente salassati e il siero dei due cani mescolato insieme. Così quello dei quattro conigli. Quindi divisi in fialette di 10 cmc. e tenuti in ghiacciaia a + 4° C, pronti per l'uso.

Essi infatti vennero inoculati a conigli nuovi in dosi enormi, quasi 100 cmc. il siero dei cani e 30-34 cmc. quello dei conigli usando la via endovenosa per l' introduzione. I conigli sperimentati furono quattro. Due di essi vennero inoculati con vaccino poco dopo, alla 6ª ora dall'avvenuta inoculazione endovenosa del siero, e gli altri due dopo 18 giorni.

Ecco i risultati riguardo al numero delle pustole cutanee determinate dal vaccino inoculato:

---

presunta antiendotossina del v. Pirquet. Essi intanto posseggono subito un carattere differenziale importantissimo: quello di persistere molto tempo, più ancora delle viruticidine, mentre l'antitossina pirquetiana dura poco o per lo meno si riduce in breve a quantità piccolissime. Abbiamo già visto che essi si possono trovare nei sieri i quali sono immunizzanti e non virulicidi.

Conigli trattati con	Inoculazione del vaccino praticata su la cute dopo	Numero delle pustole sviluppate su 40 cmq. di cute	Conigli di controllo inoculati sulla cute del dorso con lo stesso vaccino e nella stessa quantità — Numero delle pustole
96 cmc. di siero di cane c. s. . .	6 ore	90	confluenti (A).
94 cmc. di siero di cane c. s. . .	18 giorni	2	confluenti (B).
30 cmc. di siero di coniglio c. s.	6 ore	48	è lo stesso di A.
34 cmc. di siero di coniglio c. s.	18 giorni	4	è lo stesso di B.

Cioè la immunità si ottenne più spiccata nei conigli trattati col siero 18 *giorni prima.*

Il fatto non è però del tutto nuovo. Sappiamo già che Camus ottenne la immunità con l' inoculazione di siero fatta 12 giorni prima della vaccinazione, ma questo studioso si servì di un tale esperimento per dedurre che non esiste periodo di incubazione per l' immunità preventiva, ugualmente comportandosi, secondo i suoi esperimenti, il siero inoculato poche ore prima dell' inoculazione del virus (1).

Questo forte stato immunitario tardivo osservato negli animali, a me invece fece nascere il sospetto potesse essere il risultato di una acquisita immunità attiva. Così sono ritornato alle vecchie indagini intorno alla presenza del virus nel sangue e nel siero degli animali immunizzati ed ho eseguito nuovi ordini di ricerche, ambedue diretti a cercare il virus nei sieri immunizzanti.

---

(1) Egli inoculò nelle vene 10 cmc. di siero per kg. di animale in conigli che erano poi inoculati di vaccino 18, 5 e 3 giorni dopo. Notò che il numero delle pustole che si producevano sulla loro cute con un vaccino diluito 1 a 100 e 1 a 500 inoculato nella quantità di gr. 0,3, era incomparabilmente minore di quello che si produceva nei controlli ove si avevano pustole confluenti. E poichè ciò avveniva in tutti gli animali ne dedusse l' inutilità di una lunga incubazione per ottenere l' immunità passiva: l'animale iniettato dopo 12 giorni non essendo più immunizzato, egli dice, di quello inoculato dopo soli 3-5 giorni.

I risultati delle inoculazioni dei sieri sulla cute sono stati tutti negativi conformemente a quelli di altri studiosi (1).

A non identici risultati sono però venuto in riguardo all'inoculazione corneale, giacchè su sette sieri di cani raccolti dopo 14 giorni dalla guarigione della efflorescenza vaccinale cutanea, uno, concentrato nel vuoto fino quasi a secchezza, ha determinato nelle cellule corneali dei conigli, dei reperti granulari mobili osservabili in campo oscuro.

In queste cornee l'esame microscopico rivelava ancora le lesioni così bene descritte da Prowazeck, coi vaccini inattivati a 58°, con la presenza dei corpuscoli che l'A. riferisce a leucociti polinucleari provenienti da fagocitosi epiteliale (2).

Ho allora sottoposti a disanima tutti i sieri che man mano avevo raccolto e quelli per le ricerche in corso (3) e tra essi, mettendone insieme nove dei cani e altrettanti dei conigli, tra quelli che mi diedero i migliori risultati relativamente ad una immunità parziale tardiva, ne ricavai i dati che espongo in questa tabella, nella quale sono notati anche i risultati delle colture del virus nei leucociti sterili aggiunti ai sieri e le indagini sulle sostanze virulicide cui mi riferisco nella parte I, cap. I:

---

(1) Noto che eseguii anche inoculazioni di filtrati di sangue vaioloso e di sangue di cane inoculato con filtrati di pustole vacciniche, ma non ottenni nelle cellule corneali che un reperto granulare a granuli addossati al nucleo per nulla differenziabili da quello che ottenni con l'inoculazione di sangue di coniglio sano filtrato. (*Sul passaggio del virus vaccinico attraverso le membrane collodioniche.* Soc. tra i Cultori di Sc. Med. e Nat., 30 maggio 1908).

(2) Non è il caso di sospettare inquinamento dei sieri: essi furono raccolti con tutte le cautele ed escludo, almeno nei limiti della più rigorosa tecnica, possa essere caduto in tale errore.

(3) I sieri erano spesso da diverso tempo stati raccolti e tenuti nella ghiacciaia.

Numero conigli e cani	Provenienza del siero	Sensibilizzatrici	Sostanze virulicide	Metanticorpi	Leucociti con granuli mobili
1	da coniglio vaccinato sulla cute da 18 giorni . .	+	+	+	+
2	da 68 giorni	—	+	+	+
3	da 53 giorni	—	+	+	+
4	da 49 giorni	—	+	+	+
5	da 37 giorni	+	+	+	+
6	da 51 giorni	—	+	+	+
7	da 39 giorni	+	+	+	—
8	da 44 giorni	—	+	—	—
9	da 49 giorni	—	— ?	+	—
1	da cane vaccinato sulla cute da 33 giorni	+	+	+	+
2	da 39 giorni	+	+	+	+
3	da 43 giorni	+ ?	+	+	+
4	da 57 giorni	—	+	+	+
5	da 58 giorni	—	+	—	—
6	da 62 giorni	—	+	+	+
7	da 62 giorni	—	+	+	+
8	da 68 giorni	—	+	+	+
9	da 69 giorni	—	+	+	—

N.B. — La ricerca delle sensibilizzatrici, delle sostanze virulicide, dei metanticorpi, vennero fatte secondo la tecnica indicata nei capitoli precedenti: quelle dei granuli mobili dei leucociti, in campo oscuro.

Dove si vede che su 9 conigli, 6 presentarono il loro siero in condizioni da dar luogo alla presenza di granuli mobili nei leucociti e su 9 cani ben 7 lo presentarono nelle stesse condizioni.

È quindi logico dedurre da queste ricerche che l'esperimento di ricercare la presenza del virus nel sangue con l'inoculazione cutanea e persino con quella corneale non sia così delicato come quello da me adottato di saggiarne la esistenza nei leucociti sterili (1).

(1) Non mi nascondo l'obbiezione che il reperto granulare mobile nei leucociti possa non essere un reperto specifico. A questa obbiezione ho già risposto nel lavoro sulla coltivabilità del virus nei leucociti.

Ho allora voluto vedere come si comportassero i sieri i quali sono capaci di produrre una immunità assoluta.

In tutte le mie ricerche non ho disposto che di sei sieri che determinarono, inoculati, una immunità cutanea fortissima nei conigli.

Siero di cani inoculati con vaccino filtrato attraverso Berkefeld W per la via	Peso conigli trattati col siero	Quantità di siero inoculato sottocute — Grammi	Esito delle inoculazioni cutanee del virus praticate 20-26 giorni dal trattamento — Num. delle pustole	Inoculazioni del virus nei controlli — N. delle pustole	Reperto dei fini granuli nei leucociti aggiunti a 5 cmc. del siero dei cani
cutanea	1005	25	9 pustole	confluenti	+
cutanea	1250	30	nessuna pustola	id.	+
cutanea	1258	30	5 pustole	id.	+
cutanea	1550	40	nessuna pustola	id.	+
sottocutanea . . .	1450	35	nessuna pustola	id.	+
sottocutanea . . .	1360	30	nessuna pustola	id.	—

Cioè nei leucociti di 5 su 6 dei sieri, coi quali ottenni la immunità cutanea completa o quasi nei conigli, trovai granuli mobili. Centrifugai allora le cinque colture leucocitarie ed inoculai il deposito nelle cornee dei conigli dopo averlo pestato e tritato, per vedere se il virus esistente nei leucociti fosse o no virulento. E nel contempo istituii le volute ricerche per stabilire le proprietà virulicide del siero dei conigli trattati. Ecco i risultati messi in paragone in queste altre due tabelle che risultano anch'esse oltremodo dimostrative:

Per mio conto, dopo la pratica assunta sul reperto dei granuli mobili nel vaccino e nel vaiolo, non credo di essere in errore. Intanto è certo che gli esperimenti fatti coi leucociti contenenti detti granuli (leucociti stati nei sieri dei conigli 4°, 5° e del cane 3°) inoculati nella cornea dei conigli dopo averli triturati, mi hanno condotto a ottenere la cheratite guarneriana microscopica.

Num. d'ordine dei sieri	Siero dei conigli salassati a datare dall'intero trattamento	Proprietà virulicide del siero
1°	18 giorni.	+
2°	22 giorni.	+
3°	30 giorni.	+
4°	24 giorni.	+
5°	27 giorni.	+

N. B. — In queste tabelle + vuol dire che 1 cmc. di siero + 1 cmc. di vaccino tritato finamente (corrispondente ad una diluizione in acqua salata fatta nei rapporti di 1:100) tenuti 12 ore a + 4° e seminati su 25 cmq. della cute di un coniglio sano, dava luogo a un numero di pustole contabili mentre nei controlli si aveva una pustolosi confluente.

Provenienza dei leucociti dai sieri elencati nello stesso ordine della tabella precedente	Esito dell'innesto (col metodo del tatuaggio corneale) dei leucociti stati per 3 giorni nel siero dei conigli — Esame delle cornee praticate dopo 5 giorni
Da 1° siero	qualche citorictes.
2° »	vari citorictes.
3° »	vari citorictes.
4° »	vari citorictes.
5° »	qualche citorictes.

Certo gli anticorpi in primo tempo, le sostanze virulicide poi non possono a meno di contribuire nell'attenuare il virus. Questo è, a mio avviso, la ragione principale, oltre quella della sua scarsità, della difficoltà di metterlo in evidenza nei sieri, finora incontrata dagli studiosi, e della conclusione cui la maggior parte di essi è venuta che siano sempre sterili; mentre, come dimostrano questi esperimenti, vi si può trovare.

È in fondo è la stessa questione che va posta a proposito dell'inattivazione del virus per mezzo della temperatura e di agenti chimici quando sono trovati dotati di proprietà immunizzanti, pur essendo in condizioni d'inattivazione.

Ricorderò anzitutto i risultati delle ricerche più interessanti sottoponendole ad accurata disanima.

Noto che l'Janson nel 1891 col metodo discontinuo sterilizzando la linfa umanizzata, la trovò bensì inattiva, inoculata nelle vene dei bambini, ma inoculata nel sottocutaneo osservava poi nel decorso della vaccinazione, fatta con vaccino attivo, un acceleramento come nella rivaccinazione.

Kraus e Wolk (1) più recentemente affermarono di aver immunizzato le scimmie per via sottocutanea, inoculandole con vaccino riscaldato per mezz'ora a 58°.

Teissier, Duvoir e Gastinel nelle loro prove di controllo con vaccino tenuto a 55° mezz'ora, ottennero l'immunità cutanea e azione virulicida nei sieri, ciò che portò a far loro ritenere che a 55° il virus non fosse morto, ma semplicemente attenuato: lo sarebbe invece dopo tenuto a 100° al vapor d'acqua e a 120° nell'autoclave, poichè con vaccini così trattati non ottennero nè immunità nè azione virulicida.

Prowazeck (2) stesso, con vaccino riscaldato a 58° per un'ora, inoculato nel sottocutaneo, riuscì ad immunizzare il coniglio.

Vi sono poi le interessanti ricerche di Knöpfelmacher (3) che potè immunizzare un uomo con vaccino tenuto a 70° per mezz'ora e con quello tenuto a 58°. Col vaccino riscaldato a 70° immunizzò anche due bambini, solo gli occorse maggior quantità di vaccino di quello adoperato da Kraus e Wolk per le scimmie.

E ancora il Süpfle con linfa glicerinata diluita con soluzione salata nel rapporto di 1 a 2 tenuta in termostato ad aria calda a 58° per 1 ora praticò delle esperienze sulla cute dei conigli, ottenendo al 4°-5° giorno dei punti rilevati arrossati, il cui contenuto inoculato nella cornea dei conigli, determinò la cheratite guarneriana sebbene più debole del normale.

Evidentemente quindi, come ho detto, *a 58° la linfa non perde completamente la sua vitalità*: diminuisce di virulenza, ecco tutto: difatti l'eruzione pustolosa negli esperimenti del Süpfle ritardò soltanto ad essere completa di 3 o 4 giorni. Per quanto il Süpfle dubiti

---

(1) Kraus ü. Wolk. *Weitere studien ü. Immunität b. Syphilis und bei Vaccination gegen variola.* Wiener klin. Woch., 1906, pag. 621. *Studien ü. Immunität g. Variole-vaccine. Exper. Bedrängung einer subc. Schutzimpfung mittels verdünster vaccine.* Sitzugsber. d. K. Akad. d. Wiss., maggio 1907.

(2) Prowazeck. *Weitere Unt. ü. d. Vaccinevirus.* Centr. f. Bakt. I. Abt. Or., Bd. LVI, 1910.

(3) Knopfelmacher. *Active Immunisierung des Menschen mittels abgetöten Pockenvakzine.* Med. Klinik, n. 16, 1910. V. anche *Subcutane Injectionen von Rühpocken-Vaccine.* Wien. med. Woch., n. 45, 1906, e Zeit. f exper. Path. u. Ther., IV, 1907.

che abbiano importanza la virulenza, l'età e la provenienza delle linfe nello stabilire il termine termico per la inattivazione completa della linfa vaccinica, tuttavia i suoi esperimenti non permettono, a mio avviso, altra deduzione che questa: che la linfa inattivata a 58° non vuol dire virus ucciso.

Per mio conto nelle prime ricerche sulla resistenza del virus nei filtrati, ottenuti attraverso candele porose, ebbi a constatare che il virus poteva resistere a 60° anche per 40 minuti.

Del resto il Green (1) con vaccino stato a 60° per 1 ora triturato, filtrato attraverso candele porose o attraverso la gelatina Martin è riuscito, sebbene non sempre, ad ottenere filtrati immunizzanti, esperienze queste che parlano in favore del passaggio del virus nei filtrati, non essendo possibile ammettere quello di particolari sostanze immunizzanti poichè già noi sappiamo che in questo modo non se ne ottengono; in ogni caso l'azione immunizzante dei filtrati non dovrebbe mai mancare, ciò che invece è accaduto al Green, evidentemente in relazione col passaggio o non del virus.
E se a questa temperatura di 60°, il Süpfle, facendo permanere per 1 ora intera il virus, dichiara d'aver ricavato un materiale del tutto inattivo, tuttavia leggendo gli esperimenti di questo studioso risulta che una parte dei conigli inoculati sottocute o nelle vene con cmc. ½-2 di linfa così trattata e poi vaccinati 10 o 20 giorni dopo per la via cutanea presentavano una lesione che si accostava ad una regolare pustolazione con contenuto capace di determinare la cheratite guarneriana. Fatti questi i quali non possono a meno di far pensare che il virus non era inattivato (2).

---

(1) Green. *Some experiments on immunity against vaccinia in animals.* Journ. of Hyg., oct. 1908.

(2) Tutta la questione della resistenza del virus vaccinico vuole essere, a mio avviso, studiata. Le resistenze limitate già trovate in passato a 53° dal Carsten nel 1877 per 30 minuti, a 54° per 10 minuti dal Caroteus e Coert nel 1878, a 57° per 5 minuti dal Power, sono indubbiamente errate.

Il virus vaccinico non è così labile come si crede. L'avere constatato che alla temperatura stessa di 37°, dopo pochi giorni, perde la sua virulenza, oggimai si sa doversi a tutt'altri fattori, come ha tanto bene dimostrato il Repin (Ann. Inst. Pasteur, T. XXIII, 1909), i quali fattori non sono neppure noti tutti.

Anche il suo comportamento di fronte agli agenti chimici vuole essere di nuovo ripreso, perchè, come ho detto, giudicare della morte del virus dall'incapacità di produrre fatti cutanei e la cheratite guarneriana non è neppure esatto. Difatti vi sono lavori da cui risulta che vaccini chimicamente inattivati sono ancora immunizzanti e producono fatti microscopici nelle cornee che se non conducono alla cheratite guarneriana, tuttavia lasciano adito a sospettare abbiano una certa specificità.

Così Prowazeck dice di aver ottenuto nelle scimmie l'immunità inoculandole con linfa vaccinica stata per 6 ore in contatto con bile di co-

Il virus dunque nei sieri è attenuato ma non ucciso, come è attenuato e non ucciso in tutti quei vaccini sottoposti all'azione del calore o ad altri agenti che pur ciononostante mantengono in essi proprietà immunizzanti.

E però concludendo, *se non può a meno di ammettersi che i fenomeni immunitari parziali, i quali si susseguono immediatamente alla inoculazione dei sieri immunizzanti, siano legati a sostanze immunizzanti esistenti nei sieri che esplicano la loro azione nel momento stesso e per poche ore dopo l'avvenuta inoculazione del virus, si deve anche ammettere che la successiva immunità provocata in questi animali, sia dovuta al virus esistente nel siero per quanto scarso ed attenuato.*

E che così debbano stare le cose è avvalorato dalla circostanza, altrimenti inspiegabile, che il siero di animali trattati col siero di vaiolosi immunizzati acquista potere virulicida tanto da potersi, nelle mescolanze coi sieri degli animali trattati, ottenere persino la neutralizzazione del vaccino stesso, come dalle esperienze del Gastinel, il quale, anche in seguito all'iniezione del siero di vaiolosi, ha trovato quello degli animali trattati acquistare delle forti proprietà neutralizzanti verso il vaccino.

Del resto anche Henseval e Convent hanno rinvenuto il siero dei conigli, inoculati con siero immunizzante, dotato di potere virulicida.

Ed io potrei citare un notevole numero di esperienze eseguite con vaccino attenuato dal calore a 37°, 40°, 50° e 60° (capace di produrre nei leucociti sterili, granuli mobili e nelle cornee la cheratite guarneriana specifica), dalle quali mi è risultato *costantemente*

---

niglio, linfa divenuta incapace di produrre la cheratite guarneriana, ma quelle lesioni che egli ha descritte in seguito all'inoculazione del virus riscaldato a 58° (che non si ottengono invece con virus riscaldato a 100°) cioè fagocitosi epiteliali con presenza di 2-3 frammenti di leucociti nelle cellule.

Per mio conto posso intanto far presente che mettendo in contatto vaccino con bile ed innestate le mescolanze nelle cornee dei conigli, se si avverano le lesioni microscopiche su descritte, a tali lesioni si accompagnava sempre il reperto microscopico dei granuli mobili specifici dell'infezione vaccinica, indizio, secondo me, della presenza del virus vivente.

Anche nelle recenti ricerche del Ponndorf, di cui abbiamo già parlato, tendenti a dimostrare la possibilità di ottenere un antitossico vaccinico nei sieri degli animali inoculati con vaccino seccato e tritato, a mio avviso, come ho fatto riflettere, non si può escludere la azione del virus ancora vivente.

la possibilità di destare con questi vaccini, proprietà virulicide nel siero di animali sani. Mentre allorchè ho ripetuto le stesse ricerche con vaccini del tutto inattivi, non sono riuscito in alcun modo a destare proprietà virulicide sensibili.

Cap. II.

La esistenza e la localizzazione del virus negli organi interni.

La presenza del virus nei sieri capaci di determinare una immunità mediata negli animali non poteva a meno di far pensare alla esistenza del virus entro gli organi e anche a sospettarvi una possibile sua localizzazione.

Sulla presenza del virus negli organi dei vaiolosi non evvi dubbio alcuno.

Permangono classiche le esperienze del Monti (1) fatte su individui poche ore dopo la morte, dai quali raccolse pezzi dei vari organi e colla polpa degli stessi fece altrettante inoculazioni corneali in una serie di conigli. Così trovò che il virus oltre che sulla pelle si localizza spesso nella faringe e nella laringe: in casi singoli trovò virulento anche il midollo osseo, il testicolo, il polmone.

Ma nel vaccino invece la quistione è molto discussa: su di essa era stata richiamata l'attenzione, prima di alcune mie esperienze, dal Siegel (2) che aveva ritrovato il succo di rene di coniglio, inoculato per via corneale e filtrato attraverso le candele Chamberland, capace di determinare la cheratite guarneriana nei conigli, da Aldershoff e Broërs (3) e dal Wasielewski e Hauser (4) che ugualmente ritrovavano il virus nel rene degli animali vaccinati nella cornea.

Per mio conto il 13 aprile 1908 alla Società dei Patologi Italiani avevo comunicato che il virus vaccinico filtrato attraverso le Berkefeld W, qualunque fossero le vie di introduzione del virus, si poteva trovare nel rene e nella milza dei cani; più tardi ancora specificai che l'avevo rinvenuto in questi organi dopo 10 giorni dall'innesto cutaneo o dall'introduzione per via gastrica e dopo 8 dal-

---

(1) Monti. *Sui protozoi del vaiolo e del vaccino e sulle localizzazioni del virus vaioloso nei colpiti di vaiolo emorragico.* Soc. med. chir. Pavia, 29 aprile 1893.

(2) Siegel. *Unt. ü. d. Aetiol. d. Pocken u. d. Maul-u Klauenseuche.* A. d. Anhang z. d. Abhandl. d. K. Preuss. Akad. d. Wissensch., Berlin, 1905.

(3) Aldershoff u. Broërs. *Contribution à l'étude des corps intra-épithéliaux.* Ann. Instit. Pasteur, T. XX, 1906, p. 779.

(4) Wasieleweski u. Hauser. *U. d. Technik d. Guarnerischen Impfexper u. s. Verwendung z. Nachweis von Vaccinerregern in d. innern organen von Impftieren.* München med. Woch., 1905, p. 1189.

l'inoculazione per via sottocutanea. Il Mulas (1) nello stesso anno, nel mio Istituto, confermava che il virus vaccinico si poteva trovare in questi organi, ma più dimostrabile nel rene che nella milza. Gli esperimenti dell'A. riguardavano reni e milze di conigli estirpati dopo 3 giorni dall'inoculazione cutanea e corneale, nei quali il virus era stato ricercato: nel rene dopo 11 giorni e nella milza dopo 6 dall'estirpazione. Nel rene inoltre l'A. aveva eseguito ricerche con risultato positivo anche dopo 17 giorni dall'estirpazione, durante il quale tempo l'organo era stato tenuto 6 giorni in glicerina. Egli aveva fatte anche ricerche per dimostrare la presenza del virus nel sangue di conigli, riuscite tutte negative.

Noto che oltre alla milza e al rene, io rinvenni il virus anche nel midollo osseo di conigli inoculati sulla cute e sulla cornea dopo 10-15 e anche 20 giorni dall'inoculazione (2).

Tra le vecchie osservazioni del Reiter (3), del Pfeiffer sulla circolazione del virus nell'organismo, ricorderò quelle tendenti a dimostrare che il sangue dei bambini e degli animali è infettante, e quelle sulla infettività dei diversi organi del Froscher, del Vanselow e Freyer, del Neisser (4) il quale nelle scimmie ritrovò il midollo osseo ancora capace di determinare fatti locali dopo 15 giorni dall'inoculazione, osservazione questa la quale collima con quella da me più tardi fatta sul midollo osseo dei conigli.

Ma accanto a tutte queste ricerche ne esistono altre tendenti a negare la esistenza del virus in circolo e negli organi o per lo meno a limitarvela a brevissimo tempo. Così Paschen (5) ebbe risultato negativo dalle inoculazioni di succo di milza, delle ghiandole bronchiali, mediastiniche e soprarenali di vitelle. Calmette e Guerin (6) dimostrarono ancora una volta che in seguito all'inoculazione endovenosa del virus nei conigli, scarificando successivamente la pelle si otteneva una eruzione non più in là delle 24 ore dall'inoculazione, fatto che secondo gli AA. conduceva a ritenere che il virus non circola oltre una giornata dal praticato innesto endovenoso: gli stessi AA. confermavano del resto la sua inesistenza nel fegato, nella milza, nel polmone e nel midollo osseo dei conigli, dopo 24 ore, 2-3-4-5 giorni dall'avvenuto innesto del virus. Così il

---

(1) Mulas. *Sulla presenza del virus vaccinico negli organi dei conigli inoculati con vaccino sulla cute e sulla cornea.* Ann. Igiene sper., Roma, 1909, pag. 59.

(2) *Sulla presenza del virus vaccinico nel midollo osseo dei conigli inoculati sulla cute e sulla cornea con vaccino.* Soc. tra i Cultori di Sc. med. e nat. di Cagliari, 18 febbraio 1909.

(3) Citato da Süpfle.

(4) Neisser. *Versuche z. Uebertragung d. Syphilis auf Affen.* Deut. med. Woch., 1906, p. 1. Per gli AA. precedentemente citati si trovano le indicazioni bibliografiche nel lavoro di Süpfle.

(5) Paschen. *Was wissen wir über den Vaccineerreger?* Münch. med. Woch., 1906, p. 2391, Bd. LIII.

(6) Calmette et Guerin. *Recherches sur la vaccine expérimentale.* Ann. Inst. Pasteur, 1901, p. 161.

Prowazeck (1) prima solo, poi coll'Halberstädter (col quale sperimentò sulle scimmie per via sottocutanea), poi col Jamamoto praticò inoculazioni nelle vene dei conigli con linfa vaccinica trovando che il virus non esisteva in alcun organo (cute, midollo osseo, milza, fegato) dopo 1 ora nel sangue e dopo 4 nel peritoneo: solo ripetendo l'esperimento del Calmette e Guerin lo trovò ancora alle 48 ore dimostrabile nella pelle ove l'A. dice mantiene la sua virulenza senza ledere il tegumento ed ove non è in grado di provocare una eruzione (2).

Così ancora Haaland (3), Hauser (4), Jürgens (5), Mühlens e Hartmann (6), Nobl (7), Ohly (8) riferiscono ricerche parlanti contrariamente alla presenza del virus in circolo.

Io ho completate alcune indagini sulla presenza dei virus nel rene dei cani inoculati per via sottocutanea endovenosa e per via cutanea.

Il procedimento che ho seguìto per poter mettere in evidenza il virus è quello stesso che ho reso di pubblica ragione fino dal 1909, allorchè praticai le indagini per ricercare il virus nel midollo osseo dei conigli, cioè triturai accuratissimamente gli organi insieme a quarzo in mortaio di porcellana e di agata (aggiungendovi però in queste nuove esperienze anche la triturazione in mortaio di acciaio), diluii alquanto la poltiglia con acqua salata, centrifugai il materiale e il liquido sovrastante lo inoculai nelle cornee dei conigli

---

(1) Prowazeck. Vedi Arb. a. d. Kais. Gesumdheisamt. Bd. XXII-XXIII-XXIV; Halberstädter u. Prowazeck, *Experimentelle Unter. u. d. Vaccine d. Affen.* Id. ib., Bd. XXXVII, p. 601; Prowazeck u. Jamamoto (l. c.).

(2) L'esperimento di Calmette e Guerin ripetuto da diversi studiosi non ha in realtà sortito sempre l'identico risultato. Oltre al Prowazeck e all'Jamamoto se ne occuparono anche il Paschen e il Kelsh (Münch. med. Woch., 1909, n. 34), prima di questi, anche il Süpfle, il quale ottenne bensì una eruzione vaccinica nel corso delle prime 24 ore, quando l'inoculazione veniva fatta nelle vene e nel sottocutaneo; ma non più, quando questa veniva fatta sulla cute.

(3) Haaland. S. A. a. Med. Klin., 1905, n. 42 (Cit. da Süpfle).

(4) Hauser. Diss. Freiburg, 1905 (id.).

(5) Jürgens. *Die diagnostiche Bedeutung d. Variolakörperchen.* Berlin. klin. Woch., 1905, pag. 203, 338, 435.

(6) Mühlens u. Hartmann. *Z. Kenntnis des Vaccineerregers..* Centr. f. Bakt., Bd. XLI, pag. 203, 538, 435.

(7) Nobl. *Beiträge z. Vaccineimmunität.* Wien. klin. Woch., 1906, n. 22, p. 658. V. anche *U. d. Scutzvermögen d. subkutanen vakzineinsertion.* Wien. klin. Woch., 1906.

(8) Ohly. *Ueber d. Lebenfähigkeit d. Vaccine-virus im Kaninchenkorper.* Diss. Marburg, 1906. (Citato da Süpfle).

precedentemente tatuate, servendomi della tecnica del Negri per mantenere a contatto della cornea molta quantità di liquido. Cioè introdussi un batuffolo di ovatta sotto le palpebre, cucii la rima e per mezzo di uno schizzetto andai inoculando attraverso la rima stessa nuovo materiale, in modo da esaurire tutto il liquido nelle 24 ore. Trascorse le quali, tolsi il batuffolo e al terzo giorno feci la ricerca dei *citoryctes* e dei granuli mobili endocellulari.

In vari casi feci anche quella del virus per mezzo della coltura nei leucociti.

Si noti che gli studiosi che mi hanno preceduto in queste ricerche non sono andati più in là, per la dimostrazione del virus, della inoculazione cutanea negli animali di prova e qualcheduno anche nell'uomo, e della inoculazione endocorneale nei conigli, indubbiamente più sensibile della precedente. È una constatazione sulla quale ha fissato la sua attenzione anche il Süpfle; questi diceva, nel 1908 chiaramente, che la dimostrazione del virus del vaccino, oltre che alle difficoltà che si riscontrano già in altre malattie infettive, di stabilire l'esistenza dell'agente specifico o addirittura alla impossibilità di rinvenirlo per trovarsi esso nel sangue in quantità minima, è legata al fatto di non disporre nè di metodi morfologici, nè di metodi culturali. Unicamente, egli diceva, abbiamo l'indicazione della riuscita dell'esperimento di inoculazione sulla cute e sulla cornea, per cui si potrebbe dire che in questo problema solo risultati positivi dimostrino qualche cosa.

E il Süpfle aveva pienamente ragione. Oggi però che noi possediamo un mezzo di indagine morfologica delicatissima quale è quello della presenza dei granuli mobili endocorneali, la ricerca del virus nelle stesse cellule diventa possibile. Inoltre colla coltura nei leucociti sterili credo di avere introdotto una metodica di una grande sensibilità, poichè per mezzo suo si riesce a mettere in evidenza il virus spesso anche nei materiali ove si trova attenuato e così scarso da essere incapace di determinare la lesione guarneriana microscopica: basta infatti disgregare i leucociti delle colture perchè il materiale riproduca la stessa lesione.

Nè è il caso di obbiettare, come è stato fatto, la possibilità che il virus per effetto delle manipolazioni, strumenti, vasi, ecc., ecc., si introduca furtivamente nella tecnica dell'esperimento e dell'osservazione, giacchè lavorando accuratamente, sterilizzando bene ogni cosa, lo sperimentatore moderno, *particolarmente se batteriologo*, non incorre in tal genere di errori.

Ma io debbo far presente un'altra circostanza: che nel ricercare il virus negli organi i vari studiosi si sono rivolti a tecniche inadatte. Col triturare semplicemente un organo in un mortaio di porcellana, se il virus non è in grande quantità e virulento non lo si ottiene in condizioni da determinare lesione alcuna, neppure nelle cornee dei conigli. Ricorderò ancora una volta il noto esperimento di Prowazeck di inoculazione di leucociti contenenti il virus, riuscito negativo, finchè i leucociti non erano disgregati e tutti gli esperimenti contrari alla filtrabilità del virus, precedenti ai miei positivi, del 1903, riusciti negativi proprio per deficienza nella triturazione del materiale contenente il virus.

Io ho già pubblicato che nello stesso Istituto e nello stesso tempo in cui io lavoravo sulla filtrabilità del virus vaccinico, il Santori triturando la polpa vaccinica in presenza di quarzo e filtrandola attraverso le candele che io gli fornivo, non riusciva a dimostrare il virus nei filtrati e negava così la filtrabilità dello stesso, *che io invece dimostrava.*

Nelle stesse ricerche del Negri (1) di due anni dopo, la positività dei risultati è in gran parte legata a quella congerie di manipolazioni atte a disgregare gli elementi cellulari cutanei nei quali era indovato il virus.

Ma non è ancora tutto: qualunque tecnica che permetta di liberare dagli elementi cellulari il virus, non potrà mai condurre ad avere del materiale capace di produrre la postolosi cutanea o la cheratite guarneriana se il virus non viene liberato in notevole quantità, specialmente quando lo si ricerca nell'interno degli organi dove, giova ripeterlo, esso si trova con virulenza attenuata.

Nè migliori risultati offrono quelle tecniche seguite da vari studiosi e anche recentemente dal Prowazeck e Jamamoto (2), consistenti nel triturare gli organi, diluire il triturato con acqua salata e nell'usare il deposito del centrifugato per ricercare in esso il virus. Infatti, se la triturazione è fatta bene, è pochissimo il virus che resta nel deposito delle provette; se non è fatta bene, ciò che si centrifuga sono degli elementi cellulari nei quali il virus resta inglobato e noi sappiamo dai più volte riportati esperimenti del Prowazeck, che anche nei leucociti in queste condizioni, pure essendoci il virus, esso non si mette in evidenza.

Il virus negli organi molto bene tritati, come io ho già riferito nel citato lavoro del 1909, resta in gran parte nel liquido, da cui va separato il deposito, dato dai detriti cellulari: tutt'al più questo liquido si può concentrare, purchè la concentrazione sia fatta a temperatura non superiore a 25° C. Solo la tecnica oggidì può essere perfezionata, secondo le mie più volte riferite indagini, servendosi invece che di acqua distillata o di acqua salata per diluire la poltiglia, della nota soluzione citrosodica sterile. Si ottiene così un estratto liquido citrosodico della poltiglia stessa, nel quale si introducono dei leucociti sterili di coniglio ugualmente mantenuti sospesi in miscela citrosodica. Dopo 8 giorni si centrifugano i leucociti, si raccoglie il deposito, si pesta bene, in modo da disgregare i leucociti e si inocula nella cornea dei conigli. Aggiungo che l'esame diretto in campo oscuro nei leucociti della coltura deve far riconoscere i granuli mobili; che l'esame dell'epitelio corneale inoculato, osservato ugualmente in campo oscuro, deve mettere in evidenza lo stesso reperto; l'esame istologico dei preparati per impronta, quello dei *citoryctes*, nonchè la particolare granulosità bleu, colorando col Giemsa con la metodica che rende, secondo le mie ricerche, specifico il reperto granulare nel vaccino e nel vaiolo da me segnalato a mezzo di preparati colorati fino dal 1906 (3).

---

(1) Negri. *Ü. Filtration d. Vaccine-virus*. Z. f. Hygiene, Bd. LV, 1906.

(2) Prowazeck u. Jamamoto. *Ex. ü. morph. Studien ü. d. Vakzinevirus.* M. med. Woch, 1909.

(3) Per i particolari relativi a tutte queste tecniche vedi il mio lavoro: *I virus filtrabili vaccinico e vaioloso nella loro forma granulare*. Ann. Igiene sper., Roma, 1912.

Ciò premesso, ecco i risultati delle mie ricerche, dirette, per ora, solo a ricercare il virus nei reni, esposte nella seguente tabella:

Tempo trascorso dall'inoculazione del vaccino negli animali	Via di introduzione del virus	N.° dei reni esaminati	Reni in cui fu dimostrata la presenza del virus				
			in tutto	con la pustolosi cutanea	con i citoryctes nelle cellule corneali	con il fine reperto granulare endo-corneale	con la coltura dei leucociti
3 giorni	cutanea	15	3	—	—	—	3
	endovenosa e sottocutanea	20	10 { 6	+	+	non fatte ricerche	
			2	—	+	+	+
			2	—	—	+	+
1 mese	cutanea	20	4 { 2	—	—	—	+
			2	—	+	+	+
	endovenosa e sottocutanea	12	7 { 4	—	—	—	+
			3	—	+	+	+
40 giorni	cutanea	10	5 { 3	—	—	—	+
			2		+	+	+
	endovenosa e sottocutanea	12	9 { 3	—	—	—	+
			5	—	—	+	+
			1	—	+	+	—
2 mesi	cutanea	10	1	—	—	—	+
	endovenosa e sottocutanea	7	0	—	—	—	—

N. B. - Il segno + vuol dire che la ricerca del virus fu positiva; il segno — che la ricerca fu negativa.

Da questa tabella si ricava quanto segue:

1° degli animali inoculati da tre giorni per la via endovenosa e per la via sottocutanea, il virus si trovava in 10 su 20 dei reni ed anche in condizione da determinare: con sei di essi, pustole sulla cute dei cani e scarsi *citoryctes* nelle cornee dei conigli (non furono fatte altre ricerche); con due, la cheratite guarneriana microscopica oltre al reperto dei granuli mobili in questa e nelle colture con leucociti; con i rimanenti due, solo questi due ultimi reperti; degli animali inoculati per la via cutanea, egualmente da tre giorni, soltanto in pochi casi: 3 su 15 e solo con le colture nei leucociti;

2° degli animali inoculati per via cutanea a datare da un mese, il virus si trovava in 4 su 20 reni, di cui in due dimostrabile colla coltura nei leocociti e nei due rimanenti anche con il reperto dei granuli specifici nelle cellule corneali e qualche raro citorictes; di quelli inoculati per la via endovenosa e per la via sotto cutanea in 7 su 12 reni, di cui in 4 solo con la coltura nei leucociti e in 3 con il reperto guarneriano, i granuli endocorneali e la coltura come sopra;

3° degli animali inoculati per la via cutanea da 40 giorni il virus lo si trovava in 5 su 10 reni, di cui in 3 con la sola coltura nei leucociti, negli altri con questa e con il reperto guarneriano ed i granuli endocorneali; degli animali inoculati per la via endovenosa e sottocutanea in 9 su 12 reni, di cui in 3 con la sola coltura nei leucociti ed in 5 con il reperto dei fini granuli nelle cornee e con le colture nei leucociti; soltanto in uno lo si trovò con i citoryctes e coi fini granuli endocellulari ma non con le colture nei leucociti giacchè appartiene a questa serie il caso che non diede reperto leucocitario infettante;

4° degli animali inoculati per la via cutanea da due mesi, in 1 su 10 dei reni con la sola coltura nei leucociti; di quelli inoculati per la via sottocutanea ed endovenosa in nessun rene su 7 esaminati.

Cosicchè si può affermare che *qualunque sia la via di introduzione del virus, cutanea, sottocutanea od endovenosa, esso si può ritrovare nel rene dei cani,* nel quale compare prima, se le vie di inoculazione sono state la sottocutanea o la endovenosa. Inoltre il virus si dimostra più facilmente dimostrabile dopo qualche tempo dalla inoculazione (circa un mese); poi il reperto si fa più raro, fino a mancare, qualunque sia stata la via di inoculazione, alla fine del secondo mese.

Il fatto risultante dai suesposti esperimenti che il virus vaccinico si presentasse più facilmente dimostrabile nei reni trascorso

tempo dalla avvenuta inoculazione del virus, mi ha fatto, naturalmente, pensare ad una localizzazione del virus in quest'organo.

Su tale questione ho fermata l'attenzione di sfuggita in una nota del mio lavoro « I virus filtrabili vaccinico e vaioloso nella loro forma granulare » a proposito dei controlli che la Commissione per l'assegnazione del premio Cagnola dell' Istituto Lombardo di scienze e lettere fece ai lavori del Volpino. In detta nota accennai alla presenza dei granuli mobili del rene, direttamente inoculato con virus vaccinico. Si tratta di una osservazione che venne da me fatta in un rene inoculato direttamente per via arteriosa con linfa vaccinica filtrata attraverso Berkefeld W; gli elementi cellulari delle anse dilacerate in acqua salata mostravano contenere i granuli mobili.

L'esame dell'organo non rivelò che quello che aveva già notato il Prowazek, cioè delle lesioni limitate a gruppi cellulari che si dimostravano più rigonfi, quasi idropici, ed insieme la presenza di qualche zolla costituita da leucociti più o meno distrutti, proprio come accenna il Prowazeck a proposito delle lesioni osservate nella milza.

Insisto su questo particolare, perchè qualora si volesse concepire la localizzazione del virus nell'organismo adattandosi ancora al dogma che la pustola ne sia la sua espressione e conseguentemente che senza una pustolosi non si passa ottenere la immunità, si finirebbe col cadere in errore.

Non bisogna dimenticare che Kraus e Wolk escidendo il punto della cute scarificato, in terza giornata dalla praticata inoculazione, quando di pustola non se ne era formata alcuna, riuscirono ciò nonostante ad ottenere la immunità cutanea nelle scimmie e che Calmette e Guerin dopo l'inoculazione endovenosa del virus, se vollero ottenere la pustolosi cutanea, entro le 24 ore successive, dovettero spelare e rasare la cute degli animali come abbiamo già detto...

Del resto, se in alcuni animali in seguito alla inoculazione sottocutanea si sono ottenuti degli indurimenti nel sito di inoculazione, che si sono fatti omologhi della pustola avvalendosi dei dati del Brinckerhoff e Tyzzer (1) che affermarono la presenza di corpuscoli vaccinici nel sottocutaneo degli animali, e se si è da ciò dedotto che quando il virus si introduce nell'organismo per questa via la immunità prende punto di partenza dal tessuto sottocutaneo stesso, non si è potuto affermare essere questo un fatto costante, giacchè se ciò accade nell'uomo e nelle vitelle, non avviene poi in

---

(1) Brinckerhoff a. Tyzzer. *Studies upon exper. variola a. vaccinia in quadrumana.* The Philippine Journal of sciences, 1906, p. 211 (Rif. da molti studiosi ed in Hyg. Rundschau, 1907, p. 612).

altri animali, come nei conigli e nelle scimmie (1). Inoltre Kelsch, Camus e Tanon (2) hanno ben distinto questi indurimenti in flegmasici e in specifici, i quali ultimi sarebbero solo i tardivi.

Io stesso ho praticato un grande numero di inoculazioni sottocutanee con virus attivo, filtrato attraverso le Berkefeld W, nei conigli e nei cani e alcune nelle pecore, negli asini e nelle capre, senza riuscire ad ottenere il più piccolo indurimento nel sito di inoculazione e si noti che alcune volte il materiale che inoculavo era davvero in quantità enorme (centinaia di cmc.).

Calmette e Guerin stessi poterono vaccinare dei conigli con la inoculazione sotto la dura madre e nel cervello senza determinare lesioni apprezzabili in questi organi: eppure una porzione di cervello al 4° giorno (non più dopo 7) dall'inoculazione, triturato e semenzato sulla cute rasa di un coniglio, determinava una efflorescenza ed immunizzava l'animale.

Recentemente ancora Henseval e Convent (3) hanno reso note alcune esperienze di inoculazione endotesticolare del virus vaccinico nei conigli, in seguito alle quali hanno ottenuta la immunità negli animali, facendo notare che non hanno mai riscontrati fenomeni locali, tutt'al più una leggera tumefazione dell'organo senza indurimento.

Quindi, sia dalle mie ricerche, sia da quelle di altri studiosi si può dedurre: che la localizzazione del virus negli organi si può verificare senza fatti che possano far pensare alla produzione di lesioni che siano l'omologo della pustola, e che come la pustolosi cutanea sostenuta da tanti studiosi necessaria per ottenersi la immunità, così, la pretesa lesione omologa della pustola che dovrebbe formarsi negli organi in mancanza della prima non siano indispensabili, come vogliono alcuni AA. (cito Nobl e Knoepfelmacher) per provocare l'immunità.

Dunque, concludendo, è indubbio che anche il virus vaccinico può ritrovarsi localizzato negli organi interni sia pure in condizioni di attenuazione. E con questo fatto, che io credo di aver potuto as-

---

(1) Prowazeck ha fatto una interessante osservazione a proposito della permanenza del virus in un tessuto senza che si manifesti alcun segno della sua presenza. Egli ha notato che la regione corneale, una volta vaccinata, può per lungo tempo rimanere portatrice di parassiti, nel senso che il virus rimane stabile negli spazi intercellulari delle cellule immuni. E tale osservazione non può essere annullata dalla considerazione che fa successivamente l'A. a proposito del virus nell'organismo vaccinato dove, egli dice, non si è potuto convincere che l'organismo vaccinato rimanga portatore di parassiti ed ove egli afferma trattarsi di una *immunitas sterilisans*.

(2) Kelsch, Camus et Tanon. *De l'immunité dans ses rapports avec la voie de pénétration du vaccin dans l'organisme*. Bull. Ac. Méd., 1908, p. 128.

(3) Henseval et Convent. *Contr. à l'étude la vaccine experimentale: l'injection de vaccin dans le testicule*. Bull. de l'Ac. R. Méd. de Belgique, 1910.

sodare, resta comprensibile perchè si possa ottenere una immunità non solo più tardiva, ma anche più solida di quella immediata, mediante l'inoculazione di siero. È troppo evidente che solo in questo caso si raggiunge la vera immunità istogena, che è quella che in ultima analisi si vuole e si deve ottenere (1).

PARTE III.

L'immunità passiva antivaccinica e antivaiolosa in rapporto alla sua portata pratica.

Capitolo I.

Rapporto tra l'immunità immediata e mediata dal punto di vista pratico.

Da quanto abbiamo detto nella parte II, a mezzo dei sieri degli animali trattati, possiamo destare tanto un'immunità passiva che un'immunità attiva in animali nuovi.

---

(1) Alcuni studiosi insistono particolarmente sul concetto che la immunità antivaccinica e antivaiolosa sia una pura immunità istogena. Prowazeck e Jamamoto hanno anche eseguiti degli esperimenti che debbono essere tenuti presenti.

Inoculando linfa vaccinica sulla cute a conigli albini, e al 12° giorno (guarita l'affezione cutanea tipica) inoculando ancora loro nelle vene altro virus, non osservarono alcun fatto cutaneo sulla cute del dorso e della nuca depilata, stropicciata con carta vetrata e scarificata, ma solo una reazione banale flogistica. E lo stesso successe nei conigli controlli rivaccinati dopo 12 giorni. Ne derivarono che il rivestimento cutaneo dei conigli albini (i quali si sa che inoculati nelle vene albergano il virus per 2-24 ore, capace di svilupparsi nella cute lesa nella sua continuità) in seguito alla inoculazione cutanea, non contiene più virus e che nella cute immunizzata in precedenza il virus non può più vivere.

L'immunità vaccinica perciò, essi dicono, è una genuina immunità istogena: tanto per il vaccino quanto per il vaiolo non si può ricorrere nella pratica ad una siero-immunità; una immunità cutanea generale può oggidì concepirsi solo sulla via di una immunizzazione attiva.

Inoltre vi sono delle esperienze fatte da altri studiosi per diversi scopi che conducono agli stessi risultati.

Citerò quelle di Camus, dimostranti che i territori cellulari sensibili al virus divengono refrattari quando risentono l'azione diretta dei sieri immunizzanti come è il caso della cornea.

Si aggiunga poi quanto hanno osservato Steinhard, Israeli e Lam-

Il vantaggio tra le due sorta di immunità evidentemente spetta alla seconda, in quanto che oltre alle sostanze che provocano l'immunità immediata, coi sieri che determinano quella mediata, noi veniamo ad inoculare anche il virus, sebbene in condizioni di attenuazione, il che significa introdurre nell'organismo trattato il mezzo atto a provocare, da parte dello stesso individuo, la formazione di nuove sostanze protettrici.

E difatti abbiamo veduto, conformemente ai risultati di Camus ed Henseval, che coi sieri immunizzanti si destano in animali nuovi proprietà virulicide.

Ora, io aggiungerò che non soltanto queste ultime, ma anche metanticorpi circolanti ho potuto dimostrare negli animali così trattati.

Infatti mettendo in contatto il siero di conigli inoculati con siero antivaccinico (ottenuto da cani vaccinati sulla cute) con estratto autolitico di cute pustolosa (dotato a sua volta di proprietà immunizzanti cutanee) ho osservato una netta neutralizzazione dell'estratto, come quando si mescola siero di animali vaccinati con lo stesso estratto autolitico, usando naturalmente la medesima tecnica.

Gli esperimenti sono i seguenti:

Azione virulicida dei sieri.

Provenienza del siero	Azione virulicida del siero (1 di siero a 1 di virus diluito 1:250) — Numero delle pustole cutanee	Azione del virus sulla cute dei conigli — Numero delle pustole cutanee nei controlli
1° da un coniglio trattato con 25 cmc. di siero di cane preparato con vaccino per la via cutanea	326	pustolosi confluente.
2° da un coniglio trattato con 12 cmc. di siero di cane come sopra	268	id.
3° da un coniglio trattato con 15 cmc. di siero di cane come sopra	196	1220

BERT (*Studies on the cultivation of the virus of vaccina.* Journ. of inf. dis. 7 sett. 1913), nelle loro colture del virus vaccinico nelle cornee, *in vitro*, cioè che il virus perde la sua attività nelle preparazioni fatte con cornee di animali rivaccinati, mentre non la perde col plasma di animali vaccinati.

Azione neutralizzante dei sieri (metanticorpi).

Azione del virus sulla cute di conigli già trattati con mescolanza del siero dei conigli 1-2-3 ed estratto di cute pustolosa (1:1) ■ guarigione della lesione cutanea provocata dal trattamento	Controlli	
	Azione immunizzante dell'estratto autolitico di cute pustolosa dedotta dal numero delle pustole formatesi dall'innesto successivo di virus attivo diluito 1:500	Azione del virus vaccinico (usato negli esperimenti) sulla cute di conigli nuovi diluito 1:500
4º coniglio pustolosi confluente	6º coniglio 28 pustole	9º coniglio pustolosi confluente.
5º conigiio 2048 pustole: si può ritenere aver ottenuto una pustolosi confluente	7º coniglio 162 pustole 8º coniglio 139 pustole	10º coniglio pustolosi confluente.

N. B. - Ho indicato solo gli esperimenti completi: nei trattamenti con estratti autolitici d cute si perdono molti animali. Nel caso in ispecie furono trattati 5 conigli con le mescolanze di siero ed autolizzati ■ ne sopravvissero 2, e con l'autolizzato ben ■ di cui ne sopravvissero 3

Se poi si sceglie opportunamente il momento del salasso degli animali trattati coi sieri, in modo da farlo corrispondere al tempo in cui presumibilmente il virus ha preso sede negli organi interni, è anche possibile dimostrare la presenza in circolo di sensibilizzatrici come negli animali direttamente inoculati col virus, ciò che risulta dai seguenti esperimenti (eseguiti con antigeno rappresentato da estratto di polpa vaccinica nei rapporti di 1 a 0,2 di siero a 56º a 0,1 di complemento di cavia).

Siero di cane inoculato con vaccino sulla cute da 12 giorni	nessuna traccia di emolisi.
Id. e contemporaneamente nel sottocutaneo da 18 giorni	tracce di emolisi.
Id. da 16 giorni	nessuna traccia di emolisi.
Id. da 10 giorni	nessuna traccia di emolisi.

N. B. — Si comprende che furono eseguiti i relativi controlli ■ sempre.

D'altra parte se si saggia la solidità della immunità immediata provocata dai sieri i quali non contengono il virus dimostrabile, si trova che si tratta di una immunità più apparente che reale.

Io posso presentare il risultato di tre esperimenti eseguiti su conigli, i quali erano stati trattati con siero sicuramente non contenente il virus, nei quali conigli la vaccinazione cutanea praticata nel termine di 12 a 24 ore, diede luogo alla formazione di un numero piccolissimo di pustole anche abortive, mentre nei controlli la pustolosi si era mostrata confluente.

Orbene questi conigli rinoculati sulle cute con lo stesso vaccino dopo 10-15 giorni dal trattamento immunizzante, presentarono una pustolosi confluente come i controlli, non sottoposti ad alcun trattamento (1).

Espongo i risultati nella seguente tabella:

---

(1) Si potrebbe obbiettare che il modo di comportarsi dei conigli di fronte alla durata dell' immunità vaccinica non è costante e che in questo caso si tratti di animali in cui l' immunità era durata pochissimo. Non posso però accettare questa veduta, dacchè nei conigli vaccinati una immunità durata meno di 10-15 giorni non è concepibile.

Provenienza del siero immunizzante	Quantità di siero inoculato	1ª inoculazione di vaccino		2ª inoculazione di vaccino	
		praticata a datare dall' ultima inoculazione di siero	Esito	praticata dall' ultima inooculazione di vaccino	Esito
da un coniglio sottoposto a trattamento immunizzante con vaccino virulento per via cutanea e sottocutanea	10 cmc. per kg. di animale: una sola iniezione sottocutanea	24 ore	21 papule umide che crostificano in 5 giorni	15 giorni	pustole confluenti al 5º giorno fino al 15º giorno.
id. id.	id. due inoculazioni in giorni successivi ambedue sottocutanee	12 ore	9 papule umide che crostificano in 5 giorni	13 giorni	pustole confluenti al 5º giorno: scompaiono all' 11º giorno.
id. id.	21 cmc. di siero inoculato in una sola volta sottocute	12 ore	forte eritema e poi 5 papule molto evidenti, ma nessuna pustola Nel controllo pustole confluenti	10 giorni	pustole confluenti al 4º-5º giorno fino all'11º giorno.

Parrebbe quindi che i sieri contenenti il virus, ossia quei sieri che all'esperimento dimostrano determinare una immunità mediata al trattamento dovrebbero essere preferiti a quelli che non contengono il virus e che gli AA. che si occupano di studiare l' immunità passiva nel vaiolo non dovrebbero preoccuparsi di ottenere dei sieri sterili del virus, ma al contrario ricorrere piuttosto a quelli che lo contengono : così accanto agli effetti immunitari immediati del siero si potrebbe contare su effetti più lontani, in tutto identici a quelli che si ottengono coll' inoculazione sottocutanea dei virus attenuati, che sono sempre degli effetti immunizzanti.

Tale è almeno la conclusione derivabile dalle mie ricerche.

Debbo però aggiungere che anche con questo non posso addivenire che la sieroterapia possa avere una importanza pratica nel vaccino e nel vaiolo.

Occorre tener presente che, nella pratica il trattamento sieroterapico, dovrebbe servire in due eventualità: quando cioè occorra ottenere uno stato immunitario immediato e per scopi terapeutici.

Non evvi infatti ragione di voler con questo mezzo ottenere uno stato immunitario tardivo quando questo si raggiunge *sicuramente* e *meglio* con l' innesto cutaneo del virus ossia con la vaccinazione.

Del resto è assodato che *i sieri immunizzanti non esercitano una azione preventiva che nelle prime ore dell'avvenuta infezione* (al massimo 48 per Henseval e Convent, assai meno per Camus) e *che come curativi si può dire abbiano fallito*, poichè i miglioramenti dello stato generale nei vaiolosi, checchè ne vogliano dedurre gli studiosi che se ne sono occupati, sono assai problematici.

Camus stesso, dopo tante dettagliate ricerche insiste su questo particolare con queste testuali parole: « la thérapeutique antivariolique, au moyen des injections de sérum d'un individue immunisè, a bien peu de chance d'être utile quand elle est faite après l'apparition de l'éruption. Tout ce que l'on peut espérer de cette méthode, c'est son action preventive. On peut à la rigeuer protéger un individue qui se serait exposé à la contagion variolique, sans être vacciné, en lui injectant aussitôt du sérum antivariolique: on n'empêchera peut-être pas cet individue de faire une légère éruption qui sera très benigne ». (*Journ. de Phys. et de Path.*, 1912, p. 792).

Si aggiunga, secondo i calcoli del Camus (l. c., p. 794): per poter immunizzare completamente un uomo occorrerebbe inocularglì direttamente due litri e mezzo di siero, constatazione questa che, come giustamente dice l'A., è analoga a quella fatta da Béclère nelle sue esperienze, col siero di vitella. Ed essa, a mio avviso, rende dal punto di vista pratico, *assurdo volere anche come preventivo* ricorrere ad un tal procedimento immunitario.

CAP. II.

Tentativi per aumentare le proprietà immunizzanti dei sieri ad azione immunizzante immediata.

Stando così le cose, prima di terminare le ricerche sull'argomento dell' immunità passiva ho voluto vedere se fosse possibile ottenere dei sieri nei quali le sostanze immunizzanti virulicide e i

metanticorpi si trovassero in quantità tale da poter usare detti sieri, sia pure a solo scopo preventivo, in dosi piccole, accessibili ai bisogni della pratica.

Ad aumentare nei sieri le proprietà virulicide, si sono adoperati molti studiosi: ne cito alcuni.

Béclère, Chambon e Ménard tentarono invano di rinforzare il tenore dei sieri in sostanze antivirulenti con delle iniezioni sottocutanee di vaccino negli animali che erano stati inoculati sulla pelle.

Sperimentando con vaccino filtrato attraverso Berkefeld W, io stesso trovai che il trattamento immunizzante ha una certa importanza per provocare la immunità. Inoculando sottocute e nelle vene vaccini filtrati riuscii ad ottenere la immunità cutanea degli animali (cani, pecore, capre, asini), purchè il vaccino fosse inoculato o in dosi uguali o in dosi proporzionalmente crescenti alla distanza di 5–7 giorni: facendo l'inoculazione in una sol volta o in numero limitato di volte, invece, non ottenni l'immunità.

Teissier, Duvoir e Gastinel notano che forse la ripetizione delle inoculazioni ha importanza. Gli animali che acquistarono una immunità totale avevano ricevuto 5–14 inoculazioni; quelli che rimasero con immunità incompleta, una sola iniezione. Comunque è certo che è sempre molto difficile poter aumentare il potere virulicida in maniera costante.

Henseval e Convent hanno dimostrato che gli animali più fortemente immunizzati sono quelli che presentano il loro siero maggiormente fornito di proprietà virulicide il che si ottiene specialmente col trattamento per via endovenosa, per quanto abbiano anche trovato che nei conigli con eruzione confluente il potere virulicida del siero era analogo.

Prowazeck e Beaurepaire de Aragâo, sperimentando nell'uomo e nelle scimmie sono venuti a risultati, si può dire negativi: essi dicono: se è possibile, con inoculazioni ripetute nel corso di tre anni aumentare a poco a poco nel siero umano, o con iniezioni ipodermiche nel sangue di scimmie, gli anticorpi vaccinici (che messi per 24 ore in contatto con il virus vaccinico lo attenuino o lo inattivino), fin ora però non si è pervenuti a dimostrare in un siero di vaioloso di 12-15-20-24-30-40 giorni anticorpi che inattivino del tutto il virus, giacchè ogni volta nei relativi preparati istologici vennero più o meno messi in evidenza corpuscoli di Guarnieri, ecc., ecc.

Lo stesso Camus dopo tanti esperimenti diretti a dimostrare la esistenza e la importanza per l'immunità di sostanze virulicide nel sangue, sappiamo già che finì col domandarsi se la sostanza virulicida del sangue sia l'agente principale o un semplice indice dell'immunità dei tessuti e mi pare che finisca coll'ammettere tutte e due le possibilità.

Con tutto ciò ho eseguito altri esperimenti e precisamente ho sottoposto ad un trattamento immunizzante un cane per ben otto mesi inoculandolo per via cutanea con vaccino e poi per via sottocutanea per 7 volte, ciascuna volta a distanza di un mese con gr. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 di vaccino triturato accuratamente e sempre

sospeso in 100 cmc. di liquido il quale veniva iniettato, diviso in 4 parti, in diversi punti del corpo. Salassato l'animale dopo 25 giorni dall'ultima inoculazione, sono riuscito a destare con questo siero nient'altro che una semplice immunità parziale nei conigli, e ciò usando cmc. 23,5 del siero in un coniglio, 20 in un secondo e 22 in un terzo per kg. di animale.

Non è quindi possibile ottenere sieri virulicidi qualunque sia il trattamento cui si sottopongono gli animali, i quali sieri siano capaci di destare una immunità cutanea completa nei conigli.

Stando così le cose ho fatto un ultimo tentativo diretto a provocare nei sieri la formazione di molti metanticorpi, sapendo dalle mie ricerche che queste sostanze sono un notevole se non il principale fattore dell'azione immunizzante dei sieri.

Già nell'ultima esperienza eseguita con leucociti infetti di virus autolizzati, si trovano elementi di fatto tali da derivarne che i tentativi non potevano avere un risultato molto confortante.

All'atto pratico ad ogni modo, ricorrendo al trattamento con estratto autolitico di cute pustolosa, i risultati furono non solo negativi ma addirittura opposti, inquantochè la pustolosi cutanea nei conigli trattati coi sieri così preparati evolveva tanto rapidamente e rigogliosamente da dover concludere che questo trattamento lungi dall'essere immunizzante era predisponente.

Gli esperimenti si svolsero in questo modo: si preparò un cane con inoculazioni sottocutanee di autolizzato di cute pustolosa per 4 mesi, inoculandoglielo diluitissimo nel sottocutaneo in modo che alla fine del trattamento ho calcolato di avergli inoculato non meno di 30 gr. di autolizzato. Naturalmente vennero eseguiti i dovuti controlli con lo stesso antolizzato, che inoculato sulla cute dei conigli si mostrò fornito di proprietà immunizzanti nette (si ottennero solo 12 pustole con l'inoculazione di vaccino diluito 1:300, praticata dopo 12 giorni dal trattamento, mentre nel controllo inoculato di solo vaccino se ne ottennero 467 su 25 cmq. di superfice).

Col siero di questo cane vennero inoculati nelle vene 4 conigli ciascuno con 10 cmc. di siero e poi sulla cute rasa e scarificata degli stessi venne inoculato del vaccino del commercio diluito 1:250, trascorse 48 ore nel primo, tre giorni nel secondo, nove nel terzo e diciotto nel quarto dall'ultima inoculazione. Contemporaneamente veniva inoculato un coniglio di controllo per ogni esperienza.

Si ebbe in tutti una pustolosi confluente; ma nei conigli trat-

tati le pustole divennero subito rigogliose, rilevate, spesse, come non si notavano nei controlli (1).

Inoltre, poichè, come abbiamo già veduto nella prima parte di questo lavoro, le sostanze virulicide, secondo le mie ricerche, risultarono di origine leucocitaria, e con leucociti immuni riuscivo a destare nel siero dei cani, forti proprietà virulicide, ho voluto vedere se inoculando leucociti contenenti il virus potesse aumentare questa proprietà virulicida dei sieri. Tali esperienze ho condotte insieme ad altre eseguite con leucociti normali e con leucociti contenenti il virus autolizzato con risultati appena apprezzabili come si può rilevare da questa serie di esperimenti, presa a tipo (2).

1° coniglio inoculato, con 60 cmc. di siero di un cane trattato con 1 cmc. di estratto leucocitario autolizzato di conigli sani, in 4 volte nel tempo di 18 giorni, due nel sottocutaneo e la prima e l'ultima nelle vene. Si notarono 458 pustole sulla cute innestata dopo 5 giorni dall'ultima inoculazione, con vaccino diluito 1:500. Sulla cute di un coniglio controllo si svilupparono 1250 pustole, nella stessa area.

2° coniglio inoculato con 94 cmc. di siero di un cane trattato come il precedente, ma con estratto di leucociti di conigli immuni per 5 volte nel termine di 21 giorni. Si svilupparono sulla cute 167 pustole: nel controllo si ebbe una pustolosi confluente.

3° coniglio inoculato con 103 cmc. di siero di un cane trattato con leucociti ricavati da filtrati di virus dopo 8, 12, 14, 16 giorni di coltura a 37°, autolizzati: si svilupparono 58 pustole. Nel controllo si ebbe pustolosi confluente.

Inoltre il siero di questi animali messo in contatto con gli estratti autolitici di cute pustolosa non ne inibì le proprietà immunizzanti, come fece invece il siero degli animali attivamente immunizzati.

Ho praticato mescolanze di siero con estratto autolitico nelle solite proporzioni di 1:1 e poi trascorse 24 ore ho inoculato questa mescolanza sulla cute di 4 conigli (25 cmq. di superfice).

---

(1) Noto che anche Ponndorff ha raggiunto analoghi risultati inoculando contemporaneamente nel sottocutaneo di animali vaccinati sulla cute, del midollo osseo o estratti di cute di conigli immunizzanti (il suo tossico si sarebbe dovuto trovare nelle cellule organiche degli animali fortemente vaccinati, come egli dice).

(2) Ne cito tre, i più chiari: gli esperimenti furono in realtà 7, dei quali 2 sfuggirono perchè gli animali soccombettero e 2 diedero risultati simili all'ultimo notato (69 pustole e 96 pustole, ma non si poterono fare controlli per mancanza di animali).

Dopo 14 giorni ho sulla cute risanata dei 2 conigli superstiti, inoculato vaccino diluito 1:250 con questi risultati:

1° coniglio, pustole 38; nel coniglio controllo pustolosi confluente;

2° coniglio, pustole 53, nel coniglio controllo pustolosi confluente.

Tale azione del siero degli animali preparati con l'estratto autolitico di cute infetta fa pensare che esso non contenga affatto metanticorpi, e che per la produzione degli stessi necessiti che i metantigeni si producano entro le cellule, ed entro le stesse cellule si originino i metanticorpi: almeno io per ora non saprei trovare altra spiegazione.

Inoltre è indubbio che coll'autolizzato dei leucociti contenenti il virus si riesce bensì ad ottenere un notevole stato immunitario ma l'immunità assoluta viene sempre a mancare anche inoculando dosi enormi di siero di cane trattato (circa 100 cmc.) ripetutamente con estratto leucocitario.

Per cui, concludendo, mi sono persuaso che *era impossibile poter ottenere, anche con trattamenti adeguati, sieri forniti di tali proprietà immunizzanti da provocare una azione preventiva antivaccinica e antivaiolosa rispondente ai bisogni pratici.*

Conclusioni.

Le conclusioni che si possono ricavare dal presente lavoro sarebbero molteplici, poichè nella trattazione dell'argomento, come ho detto in principio, ho dovuto approfondirmi in numerose ricerche collaterali ognuna delle quali conduce a conclusioni speciali.

Mi restringerò alle sole fondamentali.

I. Coi sieri antivaccinici e antivaiolosi si può ottenere una *immunità immediata* al trattamento *ed una immunità più tardiva o mediata.*

II. I sieri che provocano l'immunità immediata contengono generalmente delle *sostanze viruliciде* e delle *sostanze speciali immunizzanti* non ancora notate da alcuno; quelle che provocano la immunità mediata contengono oltre queste sostanze, *il virus vivente ma in condizioni di attenuazione.*

III. In detti sieri si possono però trovare anche *delle sensibilizzatrici specifiche per il virus,* ma solo nei primi tempi del trattamento, giacchè esse scompaiono molto presto; le stesse sostanze

virulicide che pure durano molto tempo in circolo, possono anche esse scomparire o ridursi al normale, mentre, le altre sostanze immunizzanti si mantengono più a lungo.

IV. Le sostanze virulicide sono di origine leucocitaria e paiono legarsi all'autolisi dei leucociti nei focolai infetti; le altre sostanze si formano nell' interno delle cellule e sono rappresentate da metanticorpi in relazione con metantigeni o veleni secondari provocati dalla presenza del virus entro le cellule, essendo possibile escludere che il virus produca tossine od endotossine e quindi che nei sieri immunizzanti esistano antitossine.

V. I sieri immunizzanti potrebbero avere una certa importanza *solo* per ottenere un'immunità immediata se questa si potesse raggiungere completa, *ciò che invece è un fatto eccezionale e raro* e se si potesse ottenerla con piccole dosi di siero, *ciò che è impossibile;* tutti i trattamenti per aumentare le proprietà virulicide dei sieri e quelli per aumentare i metanticorpi rispondendo negativamente o quasi: oltre un certo limite, *assolutamente inadeguato ai bisogni della pratica,* non aumentano le proprietà immunizzanti dei sieri.

INDICE